

**FAKULTA TEXTILNÍ
TU LIBEREC**

HANA KŘÍŽOVÁ

BAREVNÉ ZMĚNY ANTOKYANŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2011

**FAKULTA TEXTILNÍ
TU LIBEREC**

HANA KŘÍŽOVÁ

BAREVNÉ ZMĚNY ANTOKYANŮ

**COLOUR CHANGES
IN ANTHOCYANINS**

2011

Zadání:

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta textilní

Katedra textilní chemie

Školní rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

pro **Hana KŘÍŽOVOU, Bc.**

638

obor **3106T 011 Chemická technologie textilní**

Vedoucí katedry Vám ve smyslu zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách určuje tuto diplomovou práci:

Název tématu: **Barevné změny anthokyanů**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte rešerši s použitím uvedené literatury
- 2) Proměřte změny viditelných spekter v závislosti na pH na nejméně jednom typu přírodních anthokyanových barviv
- 3) Posuďte stabilitu jednotlivých strukturálních forem anthokyanových barviv, prostudujte možnosti kvantitativního stanovení množství polyfenolů v extraktech z rostlin
- 4) Anthokyany aplikujte na textilní substráty, testujte vybrané vlastnosti takto upravených textilií
- 5) Diskutujte praktickou využitelnost anthokyanů při barvení textilií

Rozsah grafických prací: -
Rozsah průvodní zprávy: cca 50 stran včetně obrázků a tabulek
Seznam odborné literatury:

- 1) Kryštůfek, J., Wiener, J.: Barvení textilií I, skriptum TU v Liberci, 2008
- 2) Velišek, J.: Chemie potravin, Osis, Tábor 2003
- 3) Vodrážka, Z.: Biochemie, Academia, Praha 1992

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jan Grégr
Konzultant: doc. Ing. Jakub Wiener, Ph.D.
Mgr. Irena Šlamberová, Ph.D.

Zadání diplomové práce: 01.10.2010
Termín odevzdání diplomové práce: 02.05.2011



Vedoucí katedry

doc. Ing. Jakub Wiener, Ph.D.

Děkan

prof. RNDr. Aleš Línka, CSc.

V Liberci dne 01.10.2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně
a s použitím literatury a pramenů uvedených v seznamu literatury.

Souhlasím s umístěním práce ve studovně TUL.

.....

Poděkování:

Chtěla bych touto cestou poděkovat:

ing. Grégrovi za příležitost zabývat se přírodními barvivy,

doc. Wienerovi za chápavý přístup a trpělivost,

prof. Kryštůfkovi za mnohou laskavost a povzbuzení,

dr. Gregorovi z Mendelovy univerzity v Brně

a doc. Zlochovi z LF v Plzni za cenné rady.

Vyznání:

Psáno

*se vzpomínkou na mého otce, jehož moudrost a nadhled mi tolik chybí,
s láskou k Vítánkovi, jehož dětská víra v mé schopnosti mi byla vzpruhou,
s vděčností k manželovi, který chápal mé důvody a byl mi oporou,
s poděkováním lidem z TUL, kteří ovlivnili můj pohled na vědu a studium,
s omluvou těm, které jsem příliš kritizovala v očekávání jejich dokonalosti,
s údivem nad tím, jak vše souvisí se vším
a s pokorou před tím, kdo stvořil tento svět.*

Anotace:

Cílem DP bylo prostudovat barevné změny rostlinných antokyanů v závislosti na změně pH prostředí, stanovit jejich obsah v různých rostlinných šťávách a posoudit možnost jejich použití v textilním barvířství.

V experimentální části byla proměřena absorpční spektra některých antokyanů, posouzena stabilita antokyanů v kyselém a zásaditém prostředí, pomocí kalibrační křivky a standardů (kyselina gallová) bylo provedeno spektrofotometrické stanovení obsahu polyfenolů ve šťávách z černého bezu, borůvek, vinné révy a červeného zelí.

Vzhledem k nejzajímavějším barevným změnám byla k barvení textilií (vlna, bavlna) použita šťáva z červeného zelí, následně proměřena remisní spektra barvených textilií, posouzena stálost vybarvení a navrženo snadné barvení vlněné textilie s opakovanými vratnými barevnými změnami.

The aim of this thesis was to study changes in vegetable anthocyanins depending on the change of pH milieu, to determine their content in different vegetable juices and to assess their possible use in textile dyeing.

In the experimental section there were measured the absorption spectra of some anthocyanins, considered stability of anthocyanidins in the acid as well as basic medium and by means of calibration curve and standards (gallic acid) was performed spectrophotometric determination of content of polyphenols and flavonoids in black elderberry, blueberries, grapevine and red cabbage juices.

For dyeing fabrics (wool and cotton) was used the juice of red cabbage because of the most interesting colour changes. Subsequently were measured the remission spectra of dyed fabrics, assessed colour permanency and proposed easy dyeing for woolen fabrics with repeated reversible colour changes.

Klíčová slova:

antokyany, antokyaniny, antokyanidiny, přírodní barviva,
antioxidanty, polyfenoly, spektrofotometrie,
pH, kyselost, zásaditost

anthocyanins, anthocyanins, anthocyanidins, natural dyes,
antioxidants, polyphenols, spectrophotometry,
pH, acidity, basicity

Obsah:

I. Teoretická část

1. Úvod	10
2. Polyfenoly	11
2.1 Enzymatické hnědnutí	12
2.2 Polyfenoly v lidském těle	12
2.3 Francouzský paradox	13
2.4 Polyfenoly proti rakovině	14
2.5 Nadbytek fenolů v potravě	15
2.6. Analýza polyfenolů	15
2.6.1 Extrakce	15
2.6.2 Metody stanovení polyfenolů	17
2.7 Stanovení antioxidační a antiradikálové aktivity polyfenolů	21
3. Flavonoidy	23
3.1 Metody stanovení flavonoidů	24
4. Antokyany	24
4.1 Struktura antokyanů	24
4.2 Výskyt antokyanů	27
4.3 Vlastnosti antokyanů	28
4.3.1 Změna barvy podle pH	28
4.3.2 Vliv teploty a záření	30
4.3.3 Kondenzační reakce	31
4.3.4 Odbarvování antokyanů	31
4.3.5 Antioxidační a antiradikálová aktivita	32
4.4 Analýza antokyanů	33
5. Spektroskopie antokyanů	34
5.1 Elektromagnetické záření	34
5.2 Spektrofotometrie	35
5.2.1 Lambert-Beerův zákon	36
5.2.2 Absorpční spektrofotometry	37
5.3 Barevnost organických látek	38
6. Antokyany jako acidobazické indikátory	40
7. Antokyany jako koloranty	41

8. Antokyany jako textilní barviva	43
8.1 Vlastnosti textilního barviva	43
8.2 Antokyany z koloristického hlediska	43
8.3 Vlákná vhodná pro barvení antokyany	44
8.3.1 Bavlna	44
8.3.2 Vlna	45
8.3.3 Polyamid	47
8.4 Různé aspekty barvení vláken antokyany	48
8.5 Stálosti vybarvení textilií antokyany	51
8.5.1 Stálost na světle	52
8.5.2 Stálost v praní	52
8.6 Objektivní hodnocení barevnosti textilií	53
8.6.1 Barevný prostor CIE-Lab	53
8.6.2 Měření barevnosti textilií	54
8.6.3 Remisní spektrofotometrie - kolorimetry	55
 II. Experimentální část	
1. Proměření absorpčních spekter některých antokyanů	58
2. Měření nestability antokyanů v zásaditém prostředí	66
3. Měření obsahu polyfenolů	72
4. Měření obsahu antokyanů	77
5. Měření degradace antokyanů	80
5.1 Měření degradačních indexů antokyanů	80
5.2 Měření tepelné degradace antokyanů	83
6. Barvení textilií antokyany	87
6.1 Barvení červeným zelím v různě kyselých lázních	87
6.2 Porovnání textilií barvených různými antokyany	94
7. Měření procenta vytažení antokyanů z lázně	97
8. Měření stálosti na světle a v praní	102
9. Závěrem	108
 Seznam použité literatury	 110

I. Teoretická část:

1. Úvod

Antokyany (též antokyaniny) jsou ve vodě rozpustné pigmenty, které jsou obsaženy v buněčných vakuolách různých rostlinných částí- v květech, plodech, listech, stoncích i podzemních částech rostlin.

Jsou zodpovědné za pestrou paletu červených, fialových a modrých odstínů květin, plodů, zelenin a semen. V rostlinách plní řadu důležitých funkcí, např. barva květů a plodů láká hmyz a zvířata k opylení a roznášení semen a antokyany jsou syntetizovány také z důvodu ochrany rostlinných pletiv před UV zářením.

Jejich typickou vlastností je změna barvy podle pH prostředí, obecně od červené v kyselém prostředí, přes purpurovou do modré v prostředí zásaditém. Chemicky jsou řazeny k **flavonoidům** a jsou významnou částí velké skupiny **polyfenolů**.

Koloristicky jsou antokyany řazeny do skupiny pyranových barviv (strukturním základem C-cyklu je heterocyklický pyran).



Obr.1 R. M. Willstätter [1]

Vlastnostmi antokyanů se zabýval také německý chemik a zakladatel rostlinné chemie **Richard Martin Willstätter** (1872 - 1942) (Obr.1), kterému byla v r.1915 udělena Nobelova cena za výzkum rostlinných pigmentů.

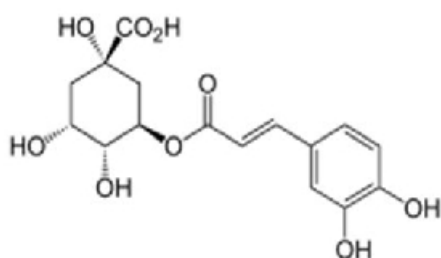
2. Polyfenoly

Polyfenoly představují pestrou skupinu chemicky velmi různorodých sloučenin, které obsahují hydroxylové skupiny vázané na aromatickém jádře.

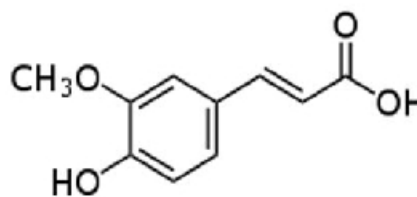
Jsou to snadno oxidovatelné látky s nízkým redox potenciálem, které jsou schopné redukovat některé radikály s oxidačními účinky (např. superoxidový, peroxylový, hydroxylový). Polyfenoly jsou širokou skupinou bioaktivních látek, které mohou díky své silné antioxidační a antiradikálové aktivitě výrazně podpořit ochrannou činnost organismu a pomoci chránit naše buňky před oxidačním poškozením. Stávají se tak pro nás důležitou složkou potravy, a to především v podobě zeleniny, ovoce, obilovin, luštěnin, brambor, čokolády, semen, ořechů, koření a nápojů rostlinného původu (čaje, káva, pivo, víno, džusy).

Polyfenoly zahrnují např. aminokyseliny (tyrosin) a éterické oleje, ale v rostlinné potravě jsou nejvíce zastoupeny především **fenolovými kyselinami** (kyselina chlorogenová, vanilová, kumarová, ferulová... Obr.2) a **flavonoidy**.

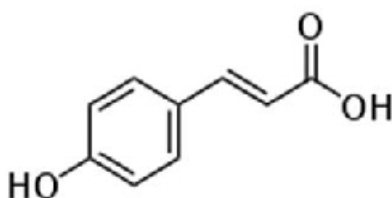
Do této druhé skupiny patří např. katechiny, flavony, flavonoly a jako velmi významná skupina právě i antokyany.



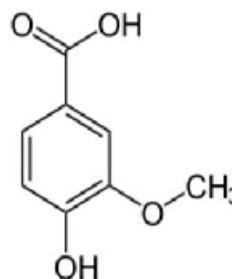
kyselina chlorogenová



kyselina ferulová



kyselina kumarová



kyselina vanilová

Obr.2 Některé fenolické kyseliny [1]

2.1 Enzymatické hnědnutí

Podstatou enzymatického hnědnutí ovoce či zeleniny (např. zhnědnutí nakrojeného jablka) je oxidace fenolů a polyfenolů. Enzymy oxidoreduktázy (např. polyfenoloxidázy či fenolázy), které jsou přítomny v odumírajících rostlinných tkáních, oxidují fenoly na chinony, které mohou dále podléhat polymeracím za vzniku barevných produktů. Substráty pro enzymatické hnědnutí jsou především o-difenoly (kyselina chlorogenová, pyrokatechol, kyselina kávová).

Polyfenolázy jsou inaktivovány při $\text{pH} < 3$, proto se ke konzervaci rostlinných potravin používá např. kyselina citronová, askorbová apod. [2]

2.2 Polyfenoly v lidském těle

Polyfenoly přijímané v potravě se účastní regulace krevního tlaku a hladiny glukózy v krvi a snižují tak riziko kardiovaskulárních nemocí, rozvoje cukrovky a obezity.

Polyfenoly mají vliv imunomodulační, antimikrobiální, inhibují vznik zánětů a mají i protitrombotické účinky a přispívají ke zlepšení aterosklerózy.

Běžná **hladina polyfenolů v krevní plazmě** je asi $1 \mu\text{mol/l}$, při příjmu vyšších dávek polyfenolů stoupne jejich hladina v plazmě až na $5 \mu\text{mol/l}$. V epidemiologických studiích je uváděno, že denní příjem polyfenolických látek by měl činit minimálně 100 mg, běžný denní příjem polyfenolů však bývá až 1 gram. [3] [4]

Na rozdíl od vitamínů a minerálů však nebyly stanoveny oficiální doporučené denní dávky a není znám klinický syndrom v důsledku nedostatečného příjmu polyfenolů. [5] Fyziologické účinky a biologická dostupnost polyfenolů a jejich metabolitů v organismu byly donedávna ještě málo prostudovanou oblastí, v současnosti se však dostávají do popředí vědeckého zájmu.

Polyfenoly podléhají rozsáhlým a různorodým přeměnám v trávicím traktu i v organismu. V lidském těle jsou resorbovány především v tenkém a tlustém střevě, ale částečně i v ústní dutině. Fenolové kyseliny mohou být resorbovány snáze než flavonoidy, flavonoidy jsou často deglykosidovány laktázou obsaženou ve vnější části membrány kartáčového lemu enterocytů. Enzym **laktáza** je zodpovědný především za hydrolyzu laktózy, mléčného cukru, je však i poměrně nespecifickou β -glukosidázou, která je schopna štěpit flavonoidní glukosidy. Hydrolyza glykonu ale patrně není nutnou

podmínkou resorpce všech flavonoidů, protože v lidské krvi i moči byly detekovány antokyany, např. kyanidin-3-glukosid nebo kyanidin -3,5-diglukosid. [3]

Po vstřebání ve střevě jsou polyfenoly dále metabolizovány ve tkáních a orgánech, především v játrech a ledvinách, podobně jako jiná xenobiotika (např. konjugací s kys.glukuronovou, glycinem, sulfatací, metylací...). Na antioxidační kapacitě krevní plazmy a již výše zmiňovaném antiradikálovém účinku se tedy v našem těle podílejí především metabolity polyfenolů. Samotný metabolismus polyfenolů je velmi variabilní také vzhledem ke genetickému polymorfismu a k individuálním odlišnostem ve složení střevní mikroflóry, aktivitě laktázy a dalších metabolických enzymů. [3]

Koncentrace polyfenolů v tlustém střevě může dosáhnout při jejich zvýšeném příjmu, nízké resorpci v tenkém střevě a zároveň díky resorpci vody v tlustém střevě poměrně vysokých koncentrací (mmol/l) a tím působit preventivně proti rakovině tlustého střeva. [3]

Polyfenoly tvoří stabilní **chelátové komplexy** s ionty kovů, především s ionty železa, které generují vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Na druhou stranu tak mohou při nadměrném příjmu především v podobě nutričních doplňků snižovat resorpci železa ve střevě, což je nežádoucí především u lidí náchylných na jeho nedostatek.[3] Mohou také vytvářet pevné komplexy s bílkovinami a tak inhibovat některé enzymy. [5][6]

2.3 Francouzský paradox

Relativně vysoký příjem tuků v potravě Francouzů (třikrát vyšší příjem nasycených tuků než v USA) a zároveň třikrát nižší úmrtnost na kardiovaskulární nemoci ve srovnání s jinými evropskými zeměmi je připisována právě protektivnímu účinku polyfenolů, které jsou ve zvýšené míře přítomné v červeném víně, jehož spotřeba je ve Francii tradičně vysoká. [7]

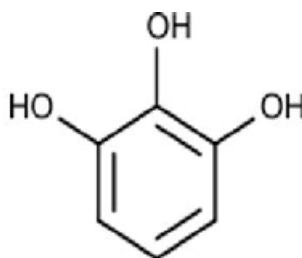
Různé studie o blahodárném vlivu červeného vína na náš organizmus prokázaly, že polyfenoly příznivě ovlivňují vznik aterosklerotických změn v cévách přes řadu mechanismů- působí např. na snížení agregace trombocytů (zhášením kyslíkového radikálu polyfenoly potlačují jeho eliminační reakci s $\text{NO}\cdot$, což je těkavý volný radikál

oxidu dusnatého s krátkým biologickým poločasem, který vzniká v endotelu cév a vyvolává mj. vazodilataci a sníženou adhezi trombocytů), dále působí na zvýšení HDL cholesterolu a jeho hlavní proteinové složky apoproteinu apoA-I, mají pozitivní vliv na tvorbu lipoproteinů (např. chelatací iontů kovů polyfenoly blokují jejich účast v iniciační a propagační fázi oxidace nenasycených mastných kyselin) a také působí na tvorbu ikosanoidů. (Polyfenoly ovlivňují enzymatickou oxidaci kyseliny arachidonové na ikosanoidy, tj. biologicky aktivní látky typu tromboxanů nebo prostaglandinů, které mají význam při regulaci krevního tlaku, srážení krve a při zánětech). [5]

2.4 Polyfenoly proti rakovině

Vliv konzumace potravin bohatých na polyfenoly na snížení rizika nádorových onemocnění není u odborné veřejnosti akceptován tolik, jako jejich pozitivní vliv na eliminaci kardiovaskulárních onemocnění. Přesto některé epidemiologické studie a experimenty na laboratorních zvířatech a nádorových buňkách prokazují antikancerogenní působení polyfenolů.

Některé práce poukazují na dvojí účinek polyfenolů - **antioxidačně/prooxidační**. Silné antioxidační polyfenoly typu pyrogallolu (Obr.3) (prodelfinidin, galláty) mají totiž zároveň i schopnost působit inhibičně či přímo cytotoxicky na nádorové buňky. V závislosti na prostředí mohou totiž superoxidové a jiné radikály nejen likvidovat, ale i samy z kyslíku generovat.



Obr.3 Pyrogallol [1]

Kyslíkové radikály vznikající při metabolických pochodech v buňkách totiž nemusí být vždy jen škodlivé. Účastní se i některých důležitých funkcí jako je např. apoptóza (programovaná buněčná smrt), dále jsou to klíčové látky v nitrobuněčných signálních kaskádách, tzv. druhí poslové, a některé kyslíkové radikály se v těle přirozeně účastní selektivní likvidace nádorových buněk. Polyfenoly tedy mohou buď radikály odklízet anebo generovat a být tak užitečné díky kombinaci obou mechanismů. [8]

2.5 Nadbytek fenolů v potravě

Jak bylo uvedeno v 2.2 , 1 g fenolických antioxidantů z potravy denně je považován za dostatečné množství potřebné k regulaci volných radikálů v krvi. Další zvyšování spotřeby je již sporné - tělo se k fenolům chová jako k cizorodým toxickým látkám, takže většina těchto látek je transformována ve střevě do nestravitelných derivátů ještě před resorpcí, a částečně také po resorpci. Proto je jen asi 10% přírodních fenolů skutečně absorbováno a může být využito pro likvidaci volných radikálů. Zvýšení denního příjmu nad 2 g by již mohlo představovat zdravotní rizika.

Strava složená z dostatečného množství ovoce, zeleniny, cereálií, čaje, červeného vína a dalších rostlinných produktů by měla být pro tělo postačujícím zdrojem antioxidantů bez nutnosti nadměrného příjmu dalších antioxidantů v podobě nutričních doplňků. [4]

2.6 Analýza polyfenolů

2.6.1 Extrakce

Polyfenoly je možné extrahovat z rostlinných materiálů čerstvých, mražených nebo lyofilizovaných. Sušení se nedoporučuje kvůli možnému snížení výtěžku extrakce a rozkladným procesům vlivem vyšší teploty. Před samotnou extrakcí se provádí **homogenizace** rostlinného materiálu, protože je nutné rozrušit rostlinná pletiva a pojivovou hmotu, která by mohla bránit difuzi extrahovaných látek. Provádí se homogenizace fyzikální, kam kromě různého mechanického rozdrobení a drcení spadá i mrazení, protože v teplotách pod bodem mrazu vznikají v buňkách krystalky ledu, které naruší celistvost buněk a po rozmrazení usnadní extrakci.

Chemická homogenizace spočívá v použití enzymů (pektinázy a celulázy) k rozrušení buněčných stěn a mezibuněčných pojiv, která jsou tvořena hlavně celulózou. Univerzální postup pro izolaci všech polyfenolů neexistuje, neboť jde o látky různě polární a tedy i různě rozpustné v polárních a nepochárních rozpouštědlech.

Polyfenoly se nejčastěji extrahují vodou, metanolem, etanolem a acetonem, s následnou extrakcí organickými lipofilními rozpouštědly (hexan, benzen, chloroform, dietyléter). Na extrakci má vliv i teplota a pH, vyšší teplota extrakci urychluje, ale zároveň může dojít k rozkladu extrahovaných látek.

Extrakce neboli vytřepávání, tedy částečné převedení rozpuštěné látky z jednoho rozpouštědla do jiného, je založena na rozdělovacích rovnováhách vícesložkových soustav. V případě extrakce polyfenolů z rostlin lze na tuto soustavu aplikovat model dvou nemísitelných kapalin a tuhé látky rozpustné v obou kapalinách, který je vyjádřen **Nernstovým rozdělovacím zákonem**. Ten říká, že nezávisle na celkovém množství látky v soustavě se tato látka rozděluje mezi daná rozpouštědla stále ve stejném poměru. Ve zředěných roztocích lze v rovnici místo aktivit použít koncentrace **(1)**

$$K = c_2 / c_1 \quad (1)$$

K rozdělovací koeficient

c_2, c_1 koncentrace extrahované látky v rozpouštědlu 2 a 1

Provádí-li se extrakce k-krát stejným množstvím V_2 čistého rozpouštědla 2, platí pro zbytkové množství extrahované látky:

$$n_z = n_0 - n_p = n_0 \left(V_1 / (V_1 + K V_2) \right)^k \quad (2)$$

n_0 původní látkové množství extrahované látky

n_p látk.množství, které při extrakci přejde do rozpouštědla č.2

n_z zbytkové množství extrahované látky

V_1, V_2 stejné objemy rozpouštědla č.1 a č.2

k počet vytřepávání

S počtem extrakčních stupňů roste výtěžnost extrakce, ale efektivní výtěžky jsou získávány max. 3-5 stupňovou extrakcí. Další extrakce jsou již vzhledem k množství vyextrahované látky málo účinné.

Antokyany se nejčastěji extrahují metanolem okyseleným HCl, případně 1% vodným roztokem HCl (nebo metanolem s 0,1% ledové kyseliny octové [9]), v případě potravinářských aplikací, kdy jsou extrakty používány k přibarvování potravin, jsou k extrakci používány vodné roztoky kyseliny octové, citronové nebo vinné [10]).

Ostatní flavonoidy se následně z roztoku oddělí extrakcí s etylacetátem, (etylacetát je nepolární rozpouštědlo, ve kterém se dobře rozpouští nepolární flavonoidy, zatímco polární antokyany zůstanou rozpuštěny v polárním metanolu). Aglykony se z antokyanů oddělí kyselou hydrolýzou (HCl) a varem pod zpětných chladičem.

Zhomogenizovaný materiál se extrahuje, dokud nepřestane barvit. Žluté flavonoidy a červené antokyany se následně stanovují spektrofotometricky na základě kalibračních křivek standardů (podle převládajících druhů antokyanidinů při 510-550 nm a flavonoidy se stanovují v abs.maximu např. kvercetinu, tj. kolem 300 nm).[11] [12] [13]

Moderní extrakční metodou je **extrakce nadkritickou tekutinou** (SFE, supercritical fluid extraction), nejčastěji nadkritickým CO₂. Výhodou této metody je minimalizace použití organických rozpouštědel a také relativně krátká doba trvání jednotlivých extrakcí.[14] [15]

2.6.2 Metody stanovení polyfenolů

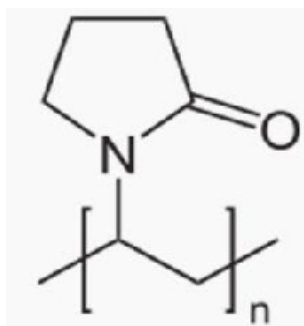
Analytické metody pro stanovení polyfenolů je možné rozdělit na skupinové metody a na metody individuální. Mezi skupinové metody patří např. stanovení podle Chapona a metoda s použitím Folin-Ciocalteuova činidla.

Nefelometrické stanovení podle Chapona je založeno na schopnosti polyfenolů tvořit komplexy s polyvinylpyrrolidonem (PVP, Obr.4). PVP se dává do roztoku vzorku až do okamžiku vzniku maximálního zákalu, který se měří nefelometrem (optický přístroj, který stanovuje množství částic v suspenzi či emulzi na základě měření intenzity rozptýleného světla kolmo na směr vstupujícího světla, nejčastější jednotkou je FNU = Formazine Nephelometric Unit, relativní jednotka vycházející z kalibrace standardní suspenzí formazinu, ke které je měřená látka vztahována). Výsledek je dán vzorcem a vyjadřuje se v miligramech PVP na litr. [16]

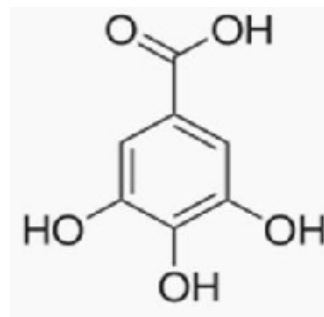
Metoda stanovení polyfenolů pomocí **činidla Folin-Ciocalteu** je spolehlivá a jednoduchá analytická spektrofotometrická metoda vyvinutá v 50.letech minulého století a propracovaná do mnohých modifikací. Je to metoda nespecifická a umožňuje

stanovit monofenoly i polyfenoly. Přestože je dnes možné stanovovat polyfenoly jinými sofistikovanými metodami, je stále používána pro orientační zjištění celkových polyfenolů a citována v mnoha vědeckých pracích. [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] Žluté Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahuje Na_2MoO_4 , Na_2WO_4 , H_3PO_4 , HCl a Li_2SO_4 . Podstatou analýzy je oxidace fenolů v zásaditém prostředí za současné redukce molybdenanu na oxid molybdeničitý. Vzniká modře zbarvený roztok, který má silnou absorpci při 765 nm. Jako standard je používána kyselina gallová (Obr.5) a výsledek se vyjadřuje jako ekvivalent koncentrace kyseliny gallové.

Činidlo se dá laboratorně připravit, jeho příprava je však velmi náročná, (wolframan a molybdenan sodný se vaří s kyselinou fosforečnou a chlorovodíkovou pod zpětným chladičem asi 10 hodin, po zchladnutí se přidá síran lithný a bróm, vaří se dalších 15 minut a po zchladnutí se roztok zředí vodou, homogenizuje a filtruje), proto se spíše vyplatí činidlo již hotové koupit (dodává jej např. firma Sigma-Aldrich nebo Penta Chrudim).



Obr.4 PVP [1]



Obr.5 Kyselina gallová [1]

Mezi analytické metody pro stanovení jednotlivých polyfenolů patří řada chromatografických metod. K jednodušším starším metodám patří např. **papírová chromatografie** (PC, paper chromatography), která používá jako stacionární fázi chromatografický papír, dále **chromatografie na tenké vrstvě** (TLC, thin layer chromatography), kde je jako stacionární fáze používán např. silikagel, celulóza nebo polyamid. Detekce je prováděna spektrofotometrickou nebo denzitometrickou analýzou barevných komplexů, které vznikly reakcí separovaných analytů s vhodnými detekčními činidly. Chromatografie na tenké vrstvě je metoda časově i finančně nenáročná, nevýhodou však je malá výtěžnost a omezená možnost kvantifikace.[24]

Vysoce účinnou a přitom poměrně rychlou a levnou metodou je **kapilární zónová elektroforéza (CZE, capillary zone electrophoresis)**, při které se k separaci používá krátká křemenná kapilára s průměrem od 50 do 100 μm . Objem analyzovaného vzorku je velmi nízký, aby nedošlo k zahlcení kapiláry. Separaci ovlivňují kromě parametrů kapiláry také nosné elektrolyty a jejich pH - flavonoidy mají v alkalickém prostředí záporný náboj. K dělení látek je využívána odlišná pohyblivost molekul (iontů) s el.nábojem ve stejnosměrném elektrickém poli, dále se zde uplatňuje také elektroosmotický tok separačního pufru. Elektroosmotický tok je spontánní tok kapaliny v kapiláře, ke kterému dochází v důsledku záporného náboje na vnitřní stěně kapiláry. Separované látky s různým el.nábojem jsou unášeny různými elektroforetickými rychlostmi až k detektoru. [25]

V současnosti je nejpoužívanější metodou pro stanovení polyfenolů **vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, high-performance liquid chromatography)** s reverzní fází. Jedná se o vysokotlakou a vysokorychlostní chromatografickou metodu, při které jsou používány kolony o délce 10 cm až 1 metr s vnitřním průměrem od 0,2 do 5 mm. Stacionární fázi představuje povrchově porézní sorbent uvnitř kolony (např. silikagel) s velikostí částic 3 - 5 μm , na které jsou chemicky vázané stacionární nepolární skupiny pro reverzní fázi (nejčastěji oktadecyl $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$). Mobilní fáze se skládá z polární i nepolární části, vodná fáze obsahuje často přídavek organických kyselin, např. kys. octové, v nepolární části jsou používána různá organická rozpouštědla (metanol, propanol, butanol, etylacetát a další). Chromatografické chování polyfenolů na koloně s reverzní fází je určeno celkovou polaritou a stereochemií sloučeniny. Jednotlivé frakce jsou při HPLC detekovány buď pomocí optických, hmotnostních nebo elektrochemických detektorů.

Při **optické detekci** protéká eluát měrnou celou o malém objemu a velké optické délce a jeho absorpce je měřena při vhodné vlnové délce. Pro antokyany je vhodnou oblastí detekce vlnová délka 515-520 nm, většina flavonoidů vykazuje dva hlavní absorpční pásy - jeden v rozmezí 320-385 nm (absorpce záření pyranovým C-kruhem) a druhý v rozmezí 250-285 nm (absorpce záření aromatickým A kruhem). Širší vlnový rozsah pro snímání spekter látek má detektor s diodovým polem (**DAD**, diode array detector).

Hmotnostní detekce (MS, mass spectrometry) je založena na poměru m/Q , tj. na poměru hmotnosti a náboje fragmentů. Vzorek je odpařen, ionizován (např. koronovým výbojem), vzniklé ionty jsou urychleny v el. poli a ve hmotnostním analyzátoru je zaznamenáván průchod a dopad iontů o různé hmotnosti a náboji. Nejlehčí ionty dopadnou jako první, kinetická energie částic se stejným nábojem bude totožná, ale jejich rychlost se bude lišit podle jejich hmotnosti. Detektor měří hodnoty indikátoru množství jednotlivých iontů v reálném čase.

Elektrochemická detekce závisí na měření elektrochemických reakcí, které souvisí s mírou oxidovatelnosti (redukovatelnosti) jednotlivých detekovaných sloučenin. Příkladem je coulometrická detekce (**CoulArray**) založená na kvantitativní oxidaci či redukcí analyzované látky na pracovní grafitové elektrodě a na využití Faradayova zákona (3). Při konstantním napětí je celkový náboj roven ploše pod křivkou závislosti proudu na čase a proud probíhající celou s analytem je úměrný koncentraci oxidovatelného (redukovatelného) analytu a s probíhající reakcí klesá. [24] [25] [26]

$$n = m / M = Q / z * F = I * t / z * F \quad (3)$$

I el.proud [A]

t ... čas [s]

F ... Faradayova konstanta, $9,6485 * 10^4$ C/mol

M ... molární hmotnost [g/mol]

m hmotnost [g]

z počet vyměněných elektronů

Q ... el.náboj [C]

n látkové množství [mol]

Jednou z nejmodernějších metod stanovování jednotlivých polyfenolů je metoda **tlakové extrakce s rozpouštědlem (PSE, pressurized solvent extraction)**.

Extrakce polyfenolů se provádí vodou modifikovanou organickým rozpouštědlem, ale

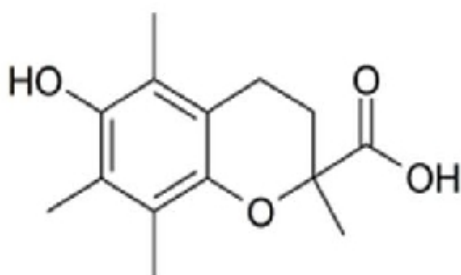
spotřeba organických rozpouštědel je výrazně menší, proto je celý proces extrakce levnější a ekologičtější. Extrakce je velmi rychlá a díky vysokým teplotám a tlakům i výtěžnější, variabilita extrakčních podmínek umožňuje nalézt podmínky pro maximální výtěžnost. Pro extrakci polyfenolů byla použita 11 ml extrakční patrona, teplota 40 - 140 °C, tlak 150 bar, tři desetiminutové extrakční cykly. Po extrakci následuje vlastní separace analytů metodou HPLC a elektrochemická analýza (CoulArray detektor). [27]

2.7 Stanovení antioxidační a antiradikálové aktivity polyfenolů

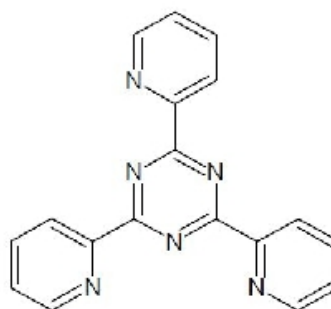
V posledních letech byly vypracovány různé metody a jejich modifikace ke stanovení celkové antioxidační aktivity látek *in vitro* (TAC = total antioxidant capacity). K chemickým metodám, které jsou většinou založeny na redox změnách použitých činidel a spektrofotometrickém stanovení absorbancí specifických barevných změn a srovnání se slepými vzorky, patří např. metoda FRAP, ABTS a DPPH. Obvykle používanými standardy, ke kterým je výsledek vztahován, jsou kyselina gallová, epikatechin nebo Trolox (Obr.6)

Fyzikální metody sledují změny fyzikálních veličin v průběhu antioxidačních pochodů.

Metoda **FRAP** (Ferric reducing antioxidant power, Ferric reducing ability of plasma) je založena na redukci železitých komplexů jako je např. TPTZ (tripirydyltriazin, Obr.7) v nízkém pH, kdy se původní komplexy, které jsou téměř bezbarvé, po redukci na železnaté komplexy změny na intenzivně modré a stanovují se fotometricky při 593 nm. [18] [28]



Obr.6 Trolox [1]

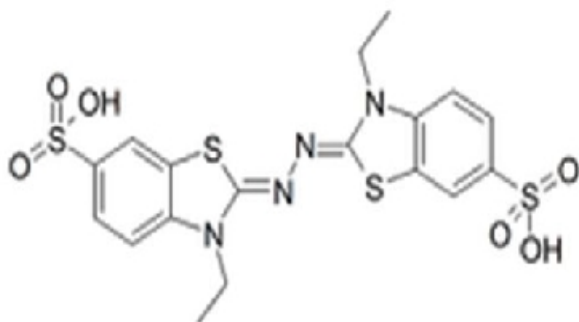


Obr.7 TPTZ [1]

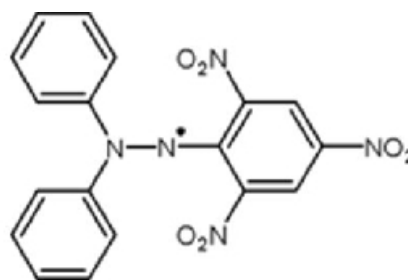
Principem metody **ABTS** je sledování inaktivace radikálového kationu $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2.-azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonát, Obr.8) vznikajícího oxidací prekursoru AAHP (2,2.-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid) např. v prostředí peroxidázy, peroxidu vodíku nebo peroxodisíranu draselného ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Vznikající $\text{ABTS}^{\bullet+}$ je zelený, má silnou absorbanci v oblasti 600-750 nm a antioxidační aktivita může být snadno stanovena spektrofotometricky. [18] [29]

DPPH (difenylpikrylhydrazyl, Obr.9) je látka, která se v prostředí etanolu nebo metanolu vyskytuje ve stavu stabilního radikálu s intenzivním fialovým zbarvením se silnou absorpcí při 525 nm. Redukce DPPH antioxidantem nebo radikálem se projeví odbarvováním roztoku, které se měří spektrofotometricky. [18] [29] [30]

Mezi fyzikální metody měření antioxidační kapacity patří např. měření redox potenciálů nebo ESR (elektronová spinová rezonance), což je metoda vhodná pro stanovení volných kyslíkových radikálů. [31]



Obr.8 ABTS [1]

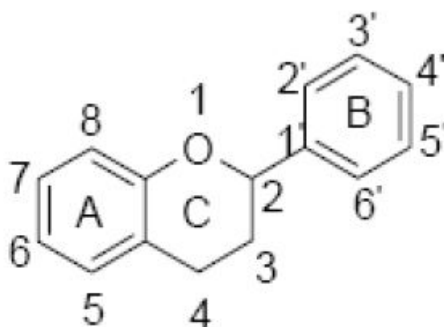


Obr.9 DPPH [1]

3. Flavonoidy

Rostlinné polyfenoly představují několik tisíc látek. Jsou děleny do různých skupin podle své chemické struktury. Základní rozdělení je do 4 velkých skupin: **fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany**. Z celkového příjmu polyfenolů tvoří asi 2/3 flavonoidy, 1/3 fenolové kyseliny, zbylé dvě skupiny se podílejí jen nepatrnou částí. [3] Flavonoidy jsou obsáhlou skupinou látek, jejichž strukturním základem je flavanový skelet tvořený 2 aromatickými jádry (A, B) a 1 pyranovým cyklem (C). Tento pyranový cyklus je zodpovědný za typické reakce flavonoidů. Obsahuje trojvazný kyslík, který svým kladným nábojem umožňuje vznik oxoniových solí s anionty. (Obr.10) [32]

Je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další. Podle stupně oxidace pyranového kruhu jsou tříděny na katechiny, leukoantokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a antokyanidiny. Strukturně příbuznými sloučeninami jsou chalkony a aurony..



Obr.10 Struktura flavanu [32]

Mnohé flavonoidy jsou významné jako rostlinná barviva, především žluté flavony a flavonoly (jejich název z latinského flavus = žlutý) je základem pojmenování celé skupiny), žluté jsou i chalkony a aurony, bezbarvé nebo nažloutlé jsou flavanony a flavanonoly a specifickou skupinou jsou červené, fialové, modré, ale i žluté a oranžové antokyany. [33]

Flavonoidy jsou jednak silné antioxidanty, jednak mají díky konjugované aromatické struktuře ochranné účinky proti UV záření.

3.1 Metody stanovení flavonoidů

Podobně jako u polyfenolů patří k orientačním technikám stanovení flavonoidů především papírová chromatografie (PC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a sloupcová chromatografie (CC). V současné době však jejich hlavní uplatnění leží v oblasti přípravy vzorku. Pro stanovení jednotlivých flavonoidů se používá kapalinová a plynová chromatografie (HPLC a GC) a elektromigrační zónová elektroforéza (CZE).

Pro identifikaci a kvantifikaci flavonoidů jsou používány analytické metody pro individuální stanovení, např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole (HPLC-DAD) nebo s hmotnostním detektorem (HPLC-MS), imunochemické metody [34] [35] atd., nicméně i zde jsou nadále používány pro běžné stanovení flavonoidů jednoduché spektrofotometrické metody založené na vzniku barevného chelátového komplexu flavonoid + ionty kovů, například hliníku.

Reakcí s chloridem hlinitým a dusitanem sodným v silně zásaditém prostředí vzniká růžově zbarvený komplex s výraznou absorbancí při 510 nm. Jako standard se nejčastěji používá katechin (tato zkouška se dříve používala ke stanovení obsahu hliníku v rýži). Výsledek se vyjadřuje jako ekvivalent koncentrace katechinu. [18] [19] [36] [37]

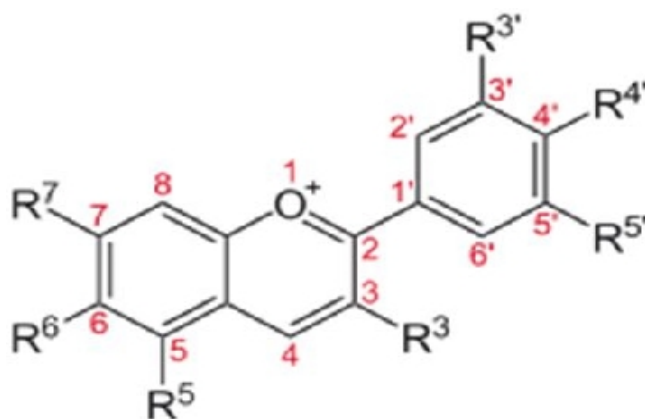
4. Antokyany

4.1 Struktura antokyanů

Antokyany se rostlinách vyskytují v podobě glykosidů - necukerná část (**aglykon**) se označuje jako **antokyanidin**. (Obr.11)

Cukernou složku antokyanů (**glykon**) tvoří nejrůznější mono-, di- i trisacharidy složené z (dosud identifikovaných) 5 monosacharidů. Podle četnosti výskytu je to D-glukóza, L-rhamnóza, D-galaktóza, D-xylóza a L-arabinóza. Nejběžnějšími disacharidy jsou rutinóza, sambubióza, soforóza, laminaribióza a genciobióza.

Sacharidy jsou navázány na antokyanidiny nejčastěji v poloze 3 a 5, výjimečně v polohách 7, 3', 5' a 4'. Volný hydroxyl v poloze 3 destabilizuje antokyanidinový chromofor a hydrolyza sacharidu v této poloze má za následek nevratnou ztrátu barvy. [33]



Obr.11 Základní struktura antokyanů [1]

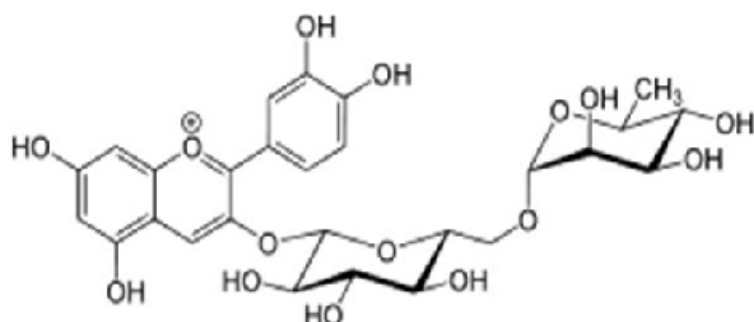
Podle počtu navázaných sacharidů se antokyaniny dělí na **3-monosidy** (mají monosacharid navázaný v poloze 3), **3-biosidy** (mají disacharid navázaný v poloze 3), **3-triosidy** (mají lineární nebo rozvětvený trisacharid navázaný v poloze 3), **3,5-diglykosidy** (mají monosacharidy navázané v polohách 3 a 5), **3,7-diglykosidy** (mají monosacharidy v polohách 3 a 7) a **3-biosidy-5-monosidy** (mají disacharid v poloze 3, monosacharid v poloze 5). Nejčastěji se vyskytují kyanidin-3-glykosidy. [33]

ANTOKYANIDIN	R3'	R4'	R5'	R3	R5	R6	R7
kyanidin	- OH	- OH	- H	- OH	- OH	- H	- OH
delfinidin	- OH	- OH	- OH	- OH	- OH	- H	- OH
malvidin	- OCH ₃	- OH	- OCH ₃	- OH	- OH	- H	- OH
pelargonidin	- H	- OH	- H	- OH	- OH	- H	- OH
peonidin	- OCH ₃	- OH	- H	- OH	- OH	- H	- OH
petunidin	- OH	- OH	- OCH ₃	- OH	- OH	- H	- OH

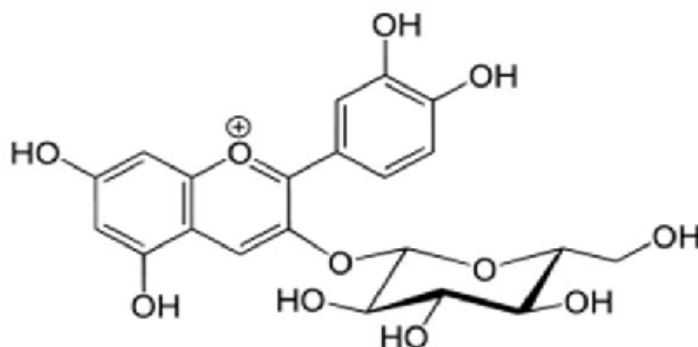
Tab.1 Nejvýznamnější antokyanidiny [1]

Cukerná část může být acylovaná kyselinou kumarovou, kávovou, ferulovou, sinapovou, hydroxybenzoovou, jablečnou, šťavelovou, maleinovou, jantarovou nebo octovou. Acylovány jsou v převážné většině 3-glykosidy. Druh cukru však nemá velký vliv na chemické vlastnosti barviv, mnohem významnější je poloha, ve které je cukr vázán. [33] [38]

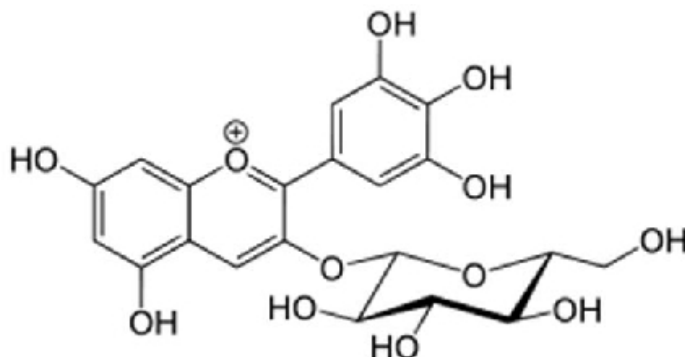
Příklady antokyanů: **sambucin** (= antirrhinin = kyanidin 3-rutinosid), **chrysantemin** (=kyanidin 3-glukosid) obsažené ve zralých plodech černého bezu, **myrtillin** (= delfinidin 3-glukosid) obsažený v borůvkách. (Obr.12) [39]



Sambucin



Chrysantemin



Myrtillin

Obr.12 Některé antokyany [1]

Druh antokyanidinu obsaženého v rostlině do značné míry určuje její barvu, červenooranžovou vytváří především obsah pelargonidinu, červenou pelargonidin s kyanidem, fialovou kyanidin s delfinidinem, modrou obvykle vyvolávají deriváty delfinidinu a chelátové komplexy kyanidinu s kovy. [39]

Mnoho rostlin však obsahuje kromě antokyanů i další barviva jako kvercetin, chlorofyly nebo karotenoidy, které ovlivňují výslednou barvu rostliny.

4.2 Výskyt antokyanů

Zdrojem antokyanů jsou mnohé rostliny, např. čeledi révovité (vinná réva), růžovité (třešně, švestky, višně, maliny, jahody, ostružiny, aronie, jablka, hrušky), lilkovité (lilek, brambory s červenou slupkou), lomikamenovité (černý a červený rybíz, červený angrešt), vřesovcovité (borůvka, brusinka), brukvovité (červené zelí, ředkvičky, červený kedluben), slézovité (ibísek), routovité (červené odrůdy pomerančů a grapefruitů), lipnicovité (červené odrůdy kukuřice), aj.

V přírodě bylo dosud identifikováno kolem 500 antokyanů [1] a mnohé rostliny jim vděčí za svou červenou, růžovou, purpurovou, fialovou, modrou nebo i oranžovou barvu. Počet samotných aglykonických antokyanidinů je oproti tomu mnohem menší (udává se kolem 15). [33] Jednotlivé antokyanidiny obsažené v různých rostlinách se liší dle substituentů (nejčastěji jde o hydroxyskupiny či methoxyskupiny), a to především v polohách 3, 5, 7 a 3', 5'.

V přírodě se nejčastěji vyskytují glykosidy **kyanidinu** (podle latinského názvu chrpy, Cyanus, fialový), **delfinidinu** (podle názvu stračky, Delphinium, purpurově modrý), **malvidinu** (podle slézu, Malva, purpurový), **pelargonidinu** (dle pelargonie, Pelargonium, šarlatově červený), **peonidinu** (podle pivoňky, Paeonia, fialový) a **petunidinu** (podle petunie. Petunia, purpurově modrý). (Tab.1) Samotné volné aglykony se vyskytují v rostlinách vzácně jen jako stopová množství produktů rozkladu antokyanů.

Některé rostliny obsahují antokyany odvozené od jediného antokyanidinu (např. jablka, červené zelí a černý bez obsahují glykosidy kyanidinu), jiné obsahují různé glykosidy více druhů antokyanidinů (černý rybíz obsahuje deriváty kyanidinu a delfinidinu, jahody obsahují deriváty pelargonidinu a kyanidinu, borůvky obsahují deriváty kyanidinu, malvidinu, petunidinu a delfinidinu, ostružiny obsahují deriváty kyanidinu a

malvidinu, hrozny modré vinné révy deriváty malvidinu a v menší míře petunidinu, peonidinu, delfinidinu, kyanidinu a pelargonidinu.atd.). [33] [38]

V práci [40] byly podrobně analyzovány antokyany v červeném zelí, jejichž obsah se v různých obdobích vývoje rostliny pohyboval od 0,09 do 1,82 mg na 1 g čerstvé váhy rostliny. Autoři dále zjistili, že při nutričním stresu se jejich obsah v rostlině zvyšuje.

V červeném zelí bylo detekováno několik derivátů kyanidinu:

1. kyanidin 3-diglukosid-5-glukosid
2. kyanidin 3-(sinapoyl)diglukosid-5-glukosid
3. kyanidin 3-(p- kumaroyl)diglukosid-5-glukosid
4. kyanidin 3-(sinapoyl)diglukosid-5-glukosid
5. kyanidin 3-(feruloyl)(feruloyl)diglukosid-5-gluckosid
6. kyanidin 3-(sinapoyl)(feruloyl)diglukosid-5-glukosid
7. kyanidin 3-(sinapoyl)(sinapoyl)diglukosid-5-glukosid

Nejvyšší obsah byl zaznamenán u derivátu č.4, 3, 1 a 7.

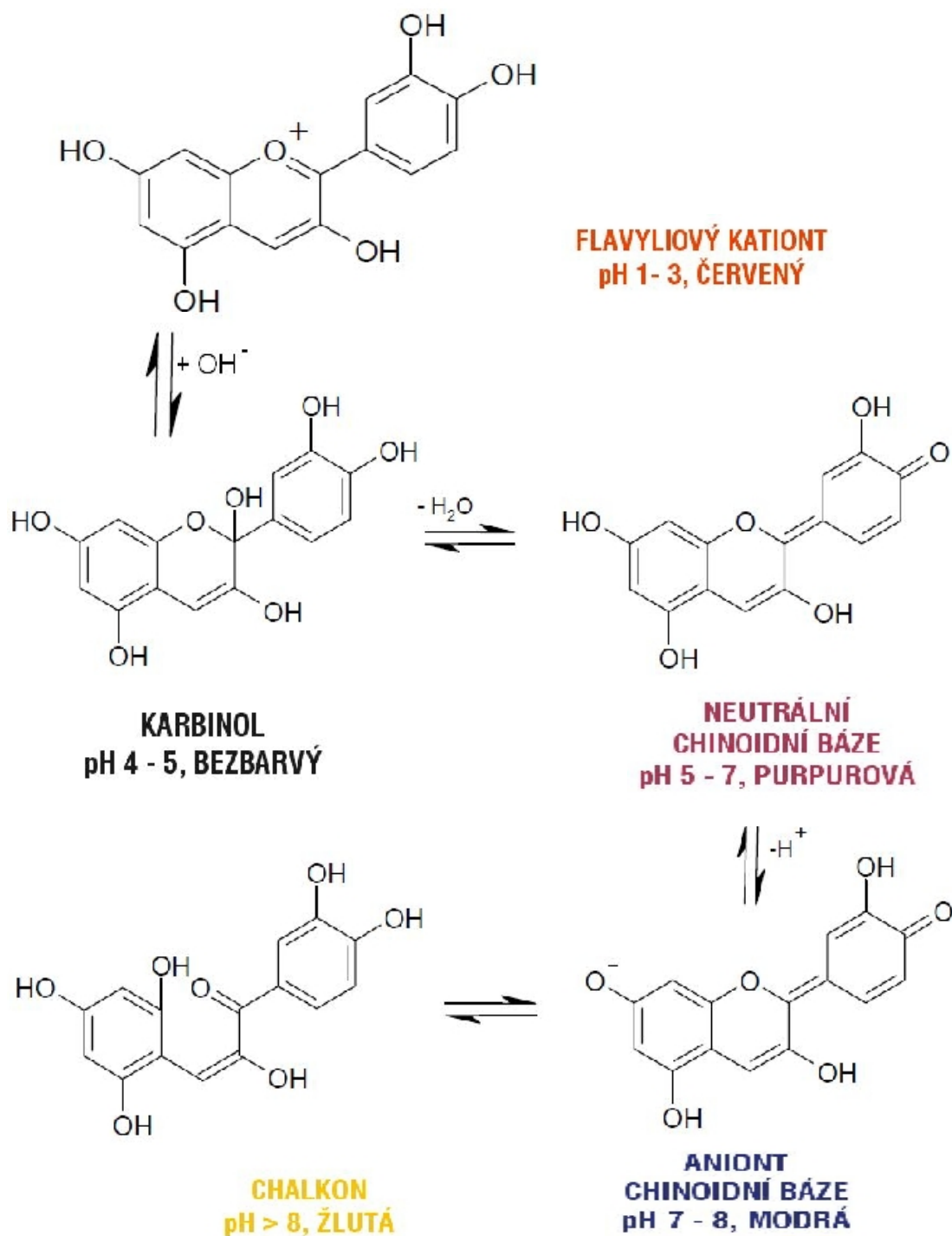
4.3 Vlastnosti antokyanů

4.3.1 Změna barvy podle pH

Jak již bylo řečeno výše, typickou vlastností antokyanů je změna jejich barvy v závislosti na pH vodného prostředí. Dochází k postupné přeměně na 5 různých struktur aglykonů:

Ve velmi kyselém prostředí existují výhradně v podobě **červených flavyliových kationtů** (solí). Při rostoucím pH postupně vzniká a stabilizuje se **bezbarvá karbinolová pseudobáze**, červená barva slábne a při pH kolem 4 - 4,5 dochází k úplnému odbarvení. Při dalším zvyšování pH vzniká **neutrální chinoidní báze**, která sebou nese purpurově červené zbarvení. Při pH 7 - 8 vzniká její **modře zbarvený aniont**. S dalším růstem pH se postupně vytrácí modré zbarvení, dochází k otevření pyranového kruhu a vznikají žluté **chalkony**. (Obr.13)

Toto je však pouze modelová soustava - v rostlinách jsou totiž tyto jednotlivé struktury stabilizovány např. tvorbou komplexů s těžkými kovy, bílkovinami, peptidy, polysacharidy nebo jinými flavonoidy.



Obr.13 Strukturní změny antokyanidinů dle pH [41]

Nejen že každý druh rostliny obsahuje charakteristická antokyanová barviva v různém množství, ale i kvantitativní zastoupení jednotlivých strukturních forem antokyanů (od flavyliových solí po chinoidní bázi) je i při stejných hodnotách pH značně rozdílné, což je příčinou různorodé barevnosti přirozených systémů. [2] [33] (Obr.23-32)

Přechody červených flavyliových solí ve fialové chinoidní báze a jejich modré anionty jsou při změnách pH velmi rychlé a vratné, transformace chalkonu je však pomalá a neprobíhá již kvantitativně.

Antokyany jsou nejstabilnější při pH 3 - 4,5. Při nižším pH probíhá především hydrolýza glykosidické vazby. Už při pH>5 začíná docházet k jejich oxidaci a v zásaditém prostředí se antokyany rozkládají. [2] (Obr.33 - 37)

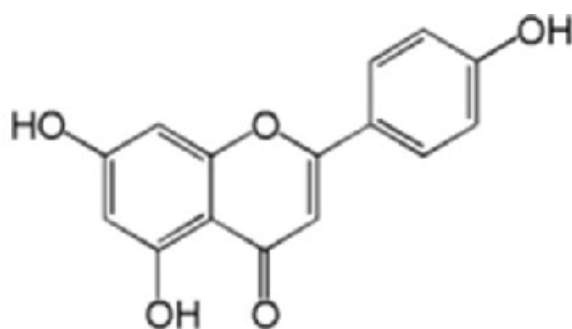
4.3.2 Vliv teploty a záření

Stabilitu antokyanů v různých prostředích ovlivňují jejich substituenty- obecně jsou glykosidy stabilnější než příslušné aglykony, v kyselém prostředí jsou stabilnější antokyany s větším počtem methoxyskupin než hydroxyskupin, na stabilitu má vliv i teplota a přítomnost kyslíku a UV záření.

Při vyšší teplotě a vyšším pH jsou antokyany značně nestabilní a dochází k jejich oxidaci. Při kyselých hodnotách pH většina antokyanů však paradoxně vykazuje dobrou stabilitu i při vyšší teplotě, což je vysvětlováno ochranným vlivem vznikajících oligomerních pigmentů. [2] [33]

Vysokou stabilitu při vyšší teplotě vykazuje i vzácný antokyanidin **apigenin** (Obr.14), který je přítomen např. v čiroku (*Sorghum bicolor*). V poloze C3 není hydroxylován, je stabilizován aromatickým kruhem a proto netvoří flavyliový kationt a zároveň je značně odolný proti tepelnému rozkladu při horké extrakci okyseleným metanolem. Nejvyšší známá koncentrace apigeninu se vyskytuje právě v nigerijském čiroku (28%), vysokou hodnotu celkových naměřených antokyanů (46%) vysvětlují autoři článku právě přítomností tepelně stabilního apigeninu, který redukuje ztrátu barvy při horké extrakci. [9]

Antokyany jsou také citlivé na ionizační záření. UV záření pohlcují a jsou tak pro rostlinné buňky ochranným UV filtrem. [42]



Obr.14 Apigenin [1]

4.3.3 Kondenzační reakce

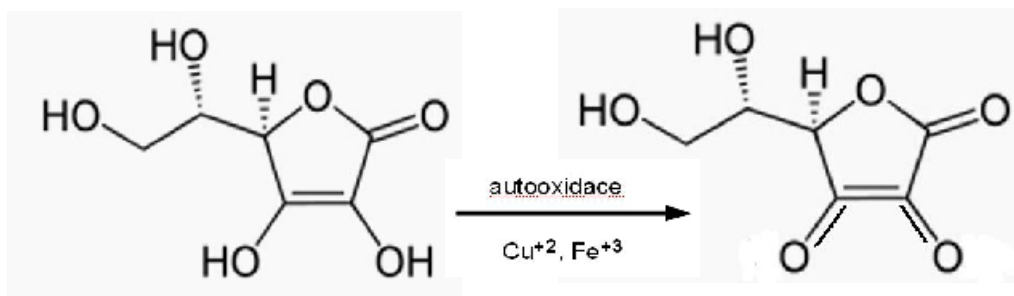
Antokyany podléhají kondenzačním reakcím, které probíhají jako **interkopigmentace** (interakce s jinými flavonoidy, katechiny a fenoly) nebo **intrakopigmentace** (interakce mezi samotnými antokyany).

Takto vznikají např. kondenzované taniny v rostlinách nebo zákaly a sedimenty u červených vín, které mají molekulovou hmotnost 700 - 3 tis. [2] [33]

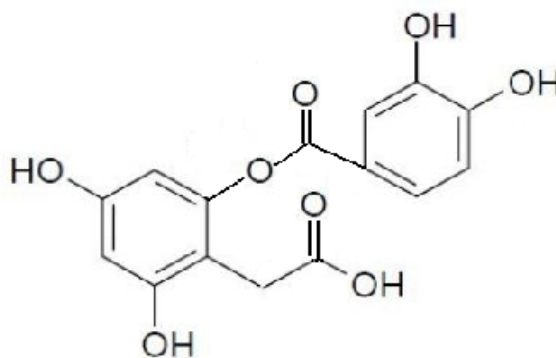
4.3.4 Odbarvování antokyanů

Působením peroxidu vodíku H_2O_2 dochází k rozštěpení pyranového cyklu a ke vzniku bezbarvých produktů, které jsou svojí strukturou velmi podobné chalkonové formě antokyanů. (Obr.15)

Peroxid vodíku se tvoří např. při oxidaci kyseliny L-askorbové (vitamín C) v přítomnosti Cu^{+2} nebo Fe^{+3} iontů, (kyselina L-askorbová je značně oxylabilní reduktor) (4) a tato reakce je např. příčinou odbarvování jahodových kompotů v konzervách. [2]



(4)



Obr.15 Odbarvený produkt oxidace peroxidem vodíku [podle 2]

4.3.5 Antioxidační a antiradikálová aktivita

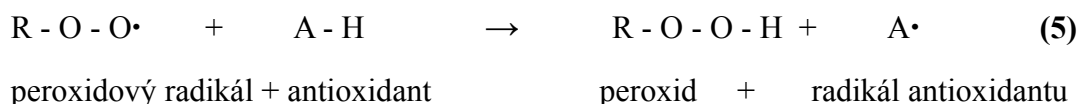
Vzdušný kyslík oxiduje antokyany na nebarevné nebo hnědě zbarvené produkty. V metabolických procesech v buňkách působí antokyany jako velmi výrazné antioxidanty a látky eliminující volné radikály. Omezují aktivitu kyslíkových radikálů a převádějí je do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů.

I v lidském těle neustále vznikají volné radikály schopné přijmout vazebný elektron od jiné sloučeniny. Tyto látky napadají a poškozují různé buněčné struktury, především buněčné membrány, proteiny a genetický materiál, působí stárnutí buněk a mohou být příčinou závažných onemocnění. Volné radikály vznikají v těle přirozeně při aerobním metabolismu, ve zvýšené míře pak při zánětech i větší námaze. Vnějšími příčinami vzniku volných radikálů jsou např. různé formy záření, škodliviny v životním prostředí, léky a pod.

Přirozeným obranným mechanismem organismu jsou radikály neustále zachytávány a likvidovány. K těmto detoxikačním pochodům využívá organismus jak lipofilní antioxidanty (např. vitamín E nebo ubiquinon Q10), které fungují hlavně v buněčných membránách, tak i hydrofilní antioxidanty, které působí především v extracelulární tekutině (vitamín C, bioflavonoidy).

Antiradikálový mechanismus **(5)** spočívá v přerušení radikálové řetězové reakce interakcí s produkty vznikajícími v iniciační nebo propagační fázi. Antioxidanty poskytují atomový vodík ke zneškodňování peroxidových nebo jiných radikálů, které vznikají jako meziprodukty řady oxidačních procesů v organismu.

Vzniklý radikál antioxidantu (fenoxylový radikál) je málo reaktivní, relativně stabilní a není schopen vyvolat další řetězovou reakci. Místo toho se deaktivuje buď spojením s dalším radikálem ($A\cdot$, $ROO\cdot$ nebo $RO\cdot$) nebo se disproportionuje na původní antioxidant a odpovídající chinon. [6] [32] [43]



4.4 Analýza antokyanů

I metody stanovení samotných antokyanů je možné rozdělit na skupinové a individuální. Mezi skupinové metody patří např. stanovení celkových antokyanů **metodou podle Harrise a Ricketse**, kdy jsou polyfenoly nejprve adsorbovány polyamidovým práškem, následně za tepla uvolněny směsí butanolu a kyseliny chlorovodíkové. Intenzita zbarvení vzniklých oxoniových solí je měřena spektrofotometrem při 550 nm proti slepému pokusu. Závislost obsahu anthokyanů na absorbanci je tabelována a výsledky se odečítají z tabulky. [9]

Metoda podle **Giustiové a Wrolstada** [23] je spektrofotometrická metoda kvantitativního stanovení antokyanů, při které je na základě měření absorbancí roztoku antokyanů při pH 1 a pH 4,5 (je počítán rozdíl při 520 a 700 nm) a při znalosti extinkčního koeficientu příslušného antokyanu vypočtena koncentrace antokyanu v roztoku dosazením do Lambert-Beerova zákona (5.2.1) a dle ředění dopočten jeho obsah ve vzorku. Je možné použít univerzálně extinkční koeficient běžného monosidu kyanidin 3- glukosidu (chrysantemin, viz Obr.12), ($26\,900 \text{ litr cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

Další varianta pro kvantifikaci obsahu antokyanů ve vzorku, či spíše způsob poměrného stanovení obsahu antokyanů, je uvedena např. v [9], kdy je jako standard vzat čistý prášek z květů laskavce (Amaranth) a na základě jeho kalibrační křivky při ředění vodou na 0,002 až 0,01% rotok (není převáděno na flavyliový kationt, patrně jde o přirozeně dostatečně kyselé prostředí) změřeny absorbance při 520 nm. Oproti tomu extrakce z čiroku a ibišku jsou prováděny okyseleným metanolem a roztoky jsou takto proměřovány při 520 nm a extrapolován jejich obsah antokyanů srovnáním s kalibrační křivkou laskavce.

Mezi jednodušší individuální metody je možné zařadit např. papírovou chromatografii, kdy se vyextrahované a přečištěné roztoky nanášejí na chromatografický papír a nechají se vyvíjet ve vhodné vyvíjecí soustavě. Chromatogramy se vyhodnocují denzitometricky (měření optické hustoty pomocí remise a transmitance při 550 nm) a antokyany se vyhodnocují na základě R_F standardních roztoků (**retenční faktor (6)** = bezrozměrná veličina daná poměrem vzdálenosti středu skvrny od startu V_m a vzdálenosti čela skvrny od startu V_r , závisí na konkrétní vyvíjecí soustavě, teplotě, množství nanesené látky a charakteru analyzované látky).

$$R_F = V_m / V_r \quad (6)$$

Pro přesné individuální stanovení antokyanů se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Přečištěné vzorky se rozdělí na analytické koloně a následně se detekují (viz 2.6.2) [12] [25]

5. Spektroskopie antokyanů

5.1 Elektromagnetické záření

Každé záření lze charakterizovat jako šíření energie prostorem. Záření vykazuje vlnový i částicový charakter. V případě elektromagnetického záření se prostorem šíří vlnění magnetického a elektrického pole. Také na elektromagnetické záření lze pohlížet jako na vlnění i proud částic (fotony) a charakterizují ho proto vlnové veličiny (vlnová délka, amplituda, frekvence, rychlost šíření) a veličiny popisující chování fotonů na základě kvantové teorie (kinetická energie).

Podle vlnové délky je elektromagnetické záření (zhruba) děleno na :

gama záření ($\lambda < 124 \text{ pm}$)

RTG záření ($\lambda = 100 \text{ pm} - 10 \text{ nm}$)

ultrafialové záření (UV) ($\lambda = 10 - 380 \text{ nm}$)

viditelné záření (VIS) ($\lambda = 380 - 760 \text{ nm}$)

infračervené záření (IR) ($\lambda = 760 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$)

mikrovlnné záření ($\lambda = 1 \text{ mm} - 10 \text{ cm}$)

a různé formy radiového záření ($\lambda = 10 \text{ cm} - \text{několik km}$)

[25]

Ze vztahů mezi energií, frekvencí a vlnovou délkou (7) a (8) vyplývá, že nejvíce energie nesou fotony gama záření, směrem k delším vlnovým délkám se energie elektromagnetického záření snižuje.

$$f = c / \lambda \quad (7)$$

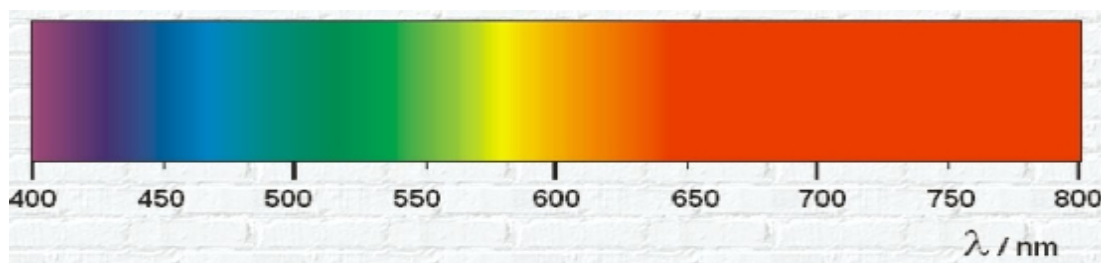
$$E = h \cdot f = h \cdot c / \lambda \quad (8)$$

f ... frekvence [$\text{Hz} = \text{s}^{-1}$] , λ vlnová délka [m]

c rychlost světla ve vakuu [$3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$]

h Planckova konstanta [$6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$]

Elektromagnetické vlnění s vlnovou délkou 380 - 760 nm nazýváme **viditelným světlem** (Obr.16). V tomto rozsahu dopadá nejvíce slunečního záření na zemský povrch. Lidské oko je přizpůsobeno tomuto rozsahu a do oblasti viditelného světla patří také lidské barevné vjemy. Interakcí viditelného světla a hmoty se zabývá **optika**.



Obr.16 Spektrum viditelného záření [44]

5.2 Spektrofotometrie

Na interakci UV/VIS světla s hmotou je založena **fotometrie** (měření při konkrétní vlnové délce) a **spektrofotometrie** (hodnocení širšího spektra světla při interakci se vzorkem). Míra pohlcování světla vzorkem je popisována absorbancí nebo transmitancí a k měření jsou používány fotometry a spektrofotometry.

Fotometrii v UV/VIS oblasti lze použít k analýze organických látek, protože absorpce v této oblasti je důkazem násobných vazeb, konjugovaného systému dvojných vazeb nebo přítomnosti některých chromoforních skupin. Porovnáním naměřených spekter se spektry známých látek lze využít UV/VIS spektrofotometrii okrajově i ke kvalitativní organické analýze, ale hlavní využití má tato metoda v analýze kvantitativní, kde se používá především ke stanovování koncentrací roztoků pomocí kalibrační křivky. [45]

5.2.1 Lambert-Beerův zákon

Transmittance (T) je bezrozměrná veličina, která popisuje, kolik světla určité vlnové délky prošlo vzorkem. (9)

$$T = I / I_0 \quad (9)$$

I intenzita světla, které prošlo vzorkem

I₀ intenzita světla, které do vzorku vstoupilo

Transmittance závisí jak na vlastnostech absorbující látky (chemické složení a koncentrace), tak na vlnové délce procházejícího světla. August Beer vycházel z více než 100 let starého objevu a pokusů Pierre Bouguera a Johanna Lamberta, aplikoval je na roztoky a vyjádřil v polovině 19.století vztah mezi těmito veličinami matematicky (10):

$$T = 10^{-\epsilon l c} \quad (10)$$

ϵ absorpční (dříve extinkční) koeficient = konstanta specifická pro danou látku při určité vln.délce [litr mol⁻¹ cm⁻¹]

l optická dráha paprsku ve vzorku (délka kyvety se vzorkem) [cm]

c molární koncentrace absorbující látky [mol litr⁻¹]

Absorbance (A) je bezrozměrná veličina, která udává, kolik světla bylo měřeným vzorkem pohlceno. Lze ji definovat na základě transmittance jako záporný dekadický logaritmus transmittance, což je zároveň i matematickou úpravou získaná linearizace vztahu pro transmittanci (9). Tento vztah se nazývá **Lambert-Beerův zákon (11)**.

Vyjadřuje lineární závislost koncentrace roztoku na měřené absorbanci a umožňuje tak fotometricky měřit koncentrace roztoků v určitém rozsahu koncentrací. Měření je prováděno při vlnové délce odpovídající maximu absorbance, kdy je chyba měření nejmenší. Při vyšších koncentracích roztoků však dochází k odchylkám od linearity vlivem dalších optických jevů na částicích v roztoku (ohyb světla, rozptyl apod.)

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (11)$$

5.2.2 Absorpční spektrofotometry

V klasickém uspořádání jsou absorpční **spektrofotometry** tvořeny zdrojem polychromatického světla (žárovka, výbojka), dále monochromátorem, který propustí světlo jen určité vlnové délky, oddílem, kde je umístěn vzorek (např. kyveta s roztokem) a detektorem (fotodioda). Porovnání se provádí se slepým vzorkem (jedno- nebo dvoukanálové spektrofotometry).

Jiným uspořádáním spektrofotometru je měření pomocí diodového pole (DAD, diode-array), kdy vzorkem prochází bílé polychromatické světlo, které je pomocí optické mřížky až po průchodu vzorkem rozloženo na jednotlivé vlnové délky. Světlo dopadá na fotodiodové pole, které je umístěno tak, že na každou diodu dopadá poměrně úzký rozsah vlnových délek. Takovéto uspořádání zkracuje měření na zlomky sekundy, nevyžaduje prakticky žádnou údržbu ani kalibraci a je přesnější než klasické fotometry. [25] (Obr.17)



Obr.17 Spektrofotometr HP 8452A s diodovým polem

5.3 Barevnost organických látek

Barva je subjektivní vjem, který závisí na fyzikálních vlastnostech barevného objektu a na vnímání pozorovatele. Vzniklý barevný vjem je výsledkem zpracování signálu v mozku - signálu, který vznikne po dopadu odraženého nebo vyzařovaného světla ve VIS spektru na sítnici pozorovatelova oka, kde podráždí příslušné receptory (čípky). Při dopadu bílého polychromatického světla na vzorek, může být toto světlo buď zcela pohlceno, pak látku vidíme jako černou, zcela odraženo, potom látku vnímáme jako bílou anebo částečně pohlceno a částečně odraženo, v tom případě vnímáme látku jako barevnou. Barva látky viditelná pro lidské oko odpovídá barvě VIS světla, které látka odráží (nebo vyzařuje), což je doplňková barva pohlceného záření. (Tab.2)

Selektivní absorpce viditelného světla je dána přítomností valenčních elektronů (např. π valenční elektrony dvojných vazeb), kterým energie fotonů viditelného spektra postačuje k excitaci a přeskoku do vyšší energetické hladiny. Energie absorbovaného záření odpovídá rozdílu energetických hladin. Při návratu excitovaného elektronu do základního stavu (na nižší energetickou hladinu) je foton opět vyzařen.

λ (nm)	Barva absorbovaného světla	Barva absorbující látky
400 - 435	fialová	žlutozelená
435 - 480	modrá	žlutá
480 - 490	zelenomodrá	oranžová
490 - 500	modrozelená	červená
500 - 560	zelená	purpurová
560 - 580	žlutozelená	fialová
580 - 595	žlutá	modrá
595 - 605	oranžová	zelenomodrá
605 - 670	červená	modrozelená

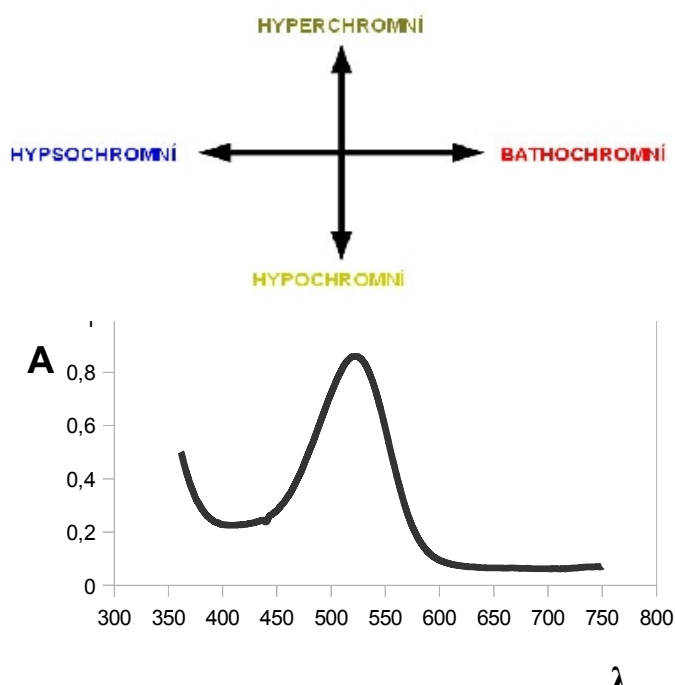
Tab.2 Komplementarita barev [46]

Chromogen je barevná látka absorbující záření v UV/VIS oblasti. Za absorpci UV/VIS záření je zodpovědný **chromofor** - funkční skupina (seskupení atomů v molekule). Obecně lze říci, že skupiny s π elektrony jsou chromofory pro UV/VIS oblast a skupiny se σ elektrony pro dalekou UV oblast.

Auxochrom je substituent nebo skupina atomů s volným elektronovým párem (např. ($-\text{Cl}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$), který zesiluje barevnost chromogenu a látka se stává barvivem. Auxochrom v konjugaci s π -elektronovým chromoforem obvykle vyvolává posun absorpčních maxim k delším vlnovým délkám. Podobně u **konjugačního efektu** dochází k posunu maximální absorpce k delším vln.délkám s rostoucím počtem konjugovaných dvojných vazeb.

Posun absorpčního maxima ke kratším vlnovým délkám je označován jako **hypsochromní** (modrý posun), posun k delším vlnovým délkám je označován jako **bathochromní** (červený posun).

Zvýšení hodnoty absorpce je **hyperchromní** efekt, snížení hodnoty absorpce je **hypochromní** efekt. (Obr.18)



Obr.18 Posuny absorpčního spektra

6. Antokyany jako acidobazické indikátory

Acidobazická titrace je metoda odměrné analýzy, která se používá ke kvantitativnímu stanovení obsahu kyseliny nebo zásady v roztoku. Principem je **neutralizační reakce** probíhající mezi kyselinou a zásadou, neboli reakce mezi hydroxoniovými kationty a hydroxidovými anionty za vzniku velmi málo disociovaných molekul vody (12).



Při acidobazické titraci se stanovuje neznámá koncentrace známého objemu vzorku kyseliny (zásady) pomocí zásady (kyseliny) o známé koncentraci a tuto spotřebu titračního činidla odečítáme v **bodě ekvivalence**, tj. v momentu, kdy spolu zreagovala veškerá kyselina a zásada. Překročení bodu ekvivalence signalizují právě acidobazické indikátory, které reagují na nadbytečný (chybějící) proton v roztoku přechodem na svoji konjugovanou formu a to je doprovázeno změnou jejich zbarvení. Pomocí titračního faktoru, molární hmotnosti stanovované složky a koncentrace a objemu spotřebovaného titračního činidla se vypočítá hmotnost stanovované látky.

Antokyany se chovají podobně jako jiné **indikátory acidobazických titrací**, např. fenolftalein, lakmus nebo metyloranž, vzhledem k jejich schopnosti přijmout nebo odštěpit proton v různě kyselém prostředí, což způsobí barevnou změnu. Indikátor se volí tak, aby jeho barevný přechod ležel v přibližném bodu ekvivalence titrační křivky. Některé antokyany mají tak výrazné barevné přechody při různých pH, že je lze použít v širším rozsahu ekvivalenčních bodů (např. antokyany v červeném zelí).

Barva rostlin s obsahem antokyanů závisí na pH tekutin ve tkáních obsahujících tyto pigmenty, což je dáno geneticky. Manipulace s geny, které regulují pH v květech, umožňuje šlechtění různých barevných variet, např. modré petúnie z původní červené. Takže možná se dočkáme dne, kdy bude růže modrá a fialka červená, i když dosavadní snaha šlechtitelů modrých růží končí jen na různých odstínech fialové ... [47]

Jako acidobazický indikátor lze použít prakticky jakýkoliv antokyan, pochopitelně i z květin a květů okrasných stromů, takto se používá např. pigment z květů ibišků (*Hibiscus rosa-sinensis*, *Hibiscus sabdarifa*) [9], z květů hlaváčku letního (*Adonis aestivalis* L), z květů a kůry tropického stromu cejby (*Bombax ceiba* L.), z květů madagaskarského stromu delonix (*Poinciana regia*) aj. Také květy růže obsahují antokyany, které v rozmezí pH 2-9 mění barvu z temně růžové po různé odstíny zelené, přičemž přidavek cínaté soli přechody v kyselé oblasti zvýrazní a posouvá bathochromně. [48]

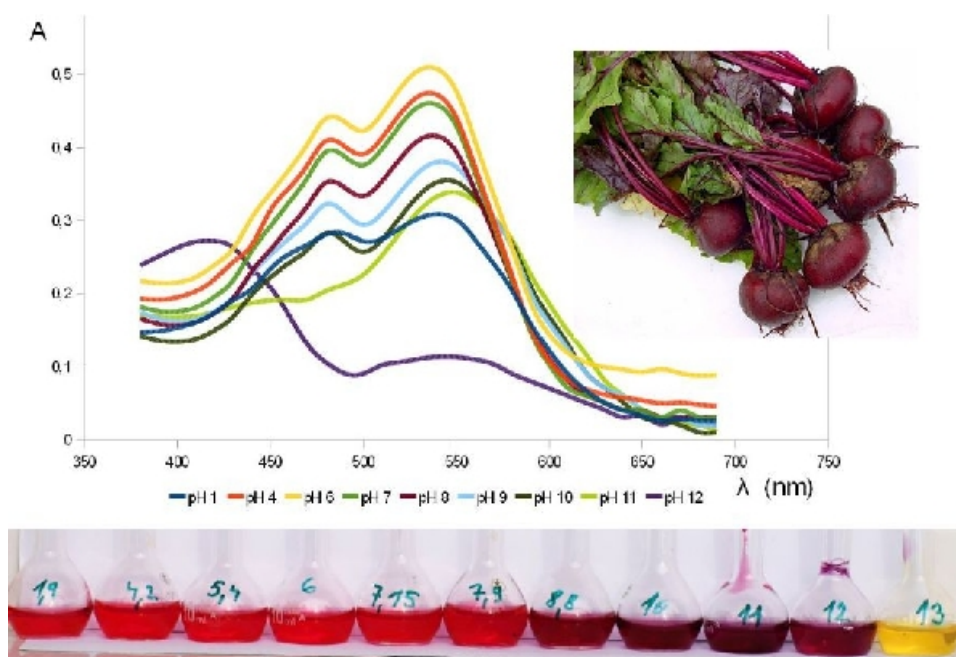
7. Antokyany jako koloranty

Brilantních odstínů flavyliových solí, silné barvicí schopnosti a relativní zdravotní nezávadnosti antokyanů (viz 2.5) se využívá v potravinářství ke **kolorizaci** (dobarvování) potravin (mléčné výrobky, nápoje, cukrovinky aj.). U nás je jejich používání zakázáno pouze v dětské výživě.

K tomuto účelu se používají nejčastěji výtažky z černého bezu, z černého rybízu, višni, ze slupek tmavých hroznů, ze zelí, případně z černé mrkve [49], a to v kyselém prostředí (nejčastěji kyseliny citronové) při pH 3-4,5, kdy jsou nejstabilnější.

Podle evropských směrnic pro používání potravinářských barviv (94/36/EC a 95/45/EC) mají tato barviva označení **E163** a pro potravinářské účely mohou být extrahována vodou s oxidem siřičitým, etanolem, metanolem, okyselenou vodou nebo oxidem uhličitým, mohou obsahovat nedefinovaný podíl organických kyselin, taninů, cukrů a minerálů a určitá definovaná množství dalších příměsí (metanol, etanol, těžké kovy).[50]

(Pozn.: barvivo z **červené řepy** (*Beta vulgaris*) je klasifikováno jako potravinářské barvivo E162, nejedná se o antokyan, ale o indolové barvivo **betanin** ze skupiny betalainů. Teoreticky je možné extrakt z řepy použít také jako acidobazický indikátor, ale barevné přechody v různých pH nejsou nijak výrazné (Obr.19). K výraznějšímu barevnému přechodu dochází až kolem pH 11, kdy se v rozmezí pH 1-10 víceméně stabilní purpurový odstín změní na žlutou barvu. Tak jako v případě antokyanů, které se změní v silně zásaditém prostředí na žluté chalkony, ani zde konverze do původní purpurové barvy už neprobíhá se změnou pH kvantitativně.)



Obr.19 Červená řepa- absorpční spektra a roztoky

Černý bez (*Sambucus nigra*) se historicky používal k přibarvování červených vín. Réva pěstovaná v oblastech s nedostatkem slunečního svitu vede ke světlejšímu zabarvení červeného vína. V Portugalsku bylo prý jednu dobu přibarvování portského vína černým bezem tak časté, že vedlo k zákazu pěstování černého bezu. Také dnes se nepoctiví vinaři snaží víno falšovat, i když je ze zákona zakázáno révová vína (tj. vína vyrobená výhradně z hroznů **vinné révy**, *Vitis vinifera*) zmnožovat (např. ředěním vodou) nebo ovlivňovat jejich základní vlastnosti - včetně barvy. U nás jsou vína kontrolována Českou obchodní inspekcí a znepokojující je, že autoři práce [38], kteří vyvinuli novou metodu analýzy příměsí černého bezu ve vínu metodou PCR, (tj. polymerázová řetězová reakce, metoda, která umožňuje na principu replikace DNA opakovaným zmnožováním primery ohraničených fragmentů DNA namnožit detekovatelné množství byť původně i jen jediné hledané molekuly) nezjistili černý bez ani ve vzorcích levných červených vín. Příčinou totiž není náhlá poctivost producentů vín, ale nejspíš to, že vinaři používají k přibarvování nikoliv netoxické bezinky, nýbrž syntetickou trest' (dříve se používal karcinogenní a hemolytický azorubin a brilantní modř). [38]

8. Antokyany jako textilní barviva

8.1 Vlastnosti textilního barviva

Textilní barvivo musí splňovat několik důležitých podmínek:

1. Musí se jednat o **barvivo**, tj. o látku, která absorbuje elektromagnetické záření v oblasti viditelného světla, tj. 380 - 760 nm. Navíc k tomu, aby látka byla schopná dostatečně intenzivně zabarvit substrát (vlákna), musí mít dostatečně velký **absorpční** (extinkční) **koeficient** ($10 - 40 \text{ tisíc litr mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
2. Barvivo s dostatečně velkým absorpčním koeficientem musí mít přilnavost (substantivitu, **afinitu**) k textilnímu substrátu.
3. Barvivo s dostatečnou afinitou k vláknu musí mít přijatelnou **stálost**, tj. dobrou stabilitu v praní, otěru, potu, na světle.
4. Barvivo určené pro oděvní textilie musí být **zdravotně nezávadné**, tj. nesmí mít alergenní, mutagenní, karcinogenní účinky.

První a čtvrtou podmínku antokyany splňují - jsou přirozeně barevné, absorpční koeficienty se pohybují v hodnotách $25 - 40 \text{ tisíc litr g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. a vzhledem k tomu, že se jedná o přirozené složky potravy, je jejich nezávadnost samozřejmostí.

Druhá podmínka závisí i na povaze barveného substrátu, splnění třetí podmínky je otázkou.

8.2. Antokyany z koloristického hlediska

Jak již bylo řečeno v kap.1, antokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty ze skupiny pyranových barviv. To je předurčuje pro barvení hydrofilních vláken, což jsou především vlákna přírodní (bavlna, vlna, hedvábí, len apod.).

Chemickým interakcím s textilními vlákny jsou přístupné především volné **hydroxylové skupiny** aglykonů (eventuelně jejich cukerných složek), takže může docházet ke slabším vazebným interakcím typu vodíkových můstků a při dostatečném přiblížení i Van der Waalsových sil.

Vodíkový můstek je slabší vazebná interakce, která vzniká mezi atomem vodíku a silně elektronegativním atomem, nejčastěji kyslíkem. Elektronegativnější kyslík k sobě přitáhne jediný elektron vodíku, čímž na vodíku vznikne částečný kladný náboj, (takřka se odhalí jeho kladně nabitě jádro) a do jeho jediného nyní už téměř prázdného (pseudovakantního) orbitalu se „natlačí“ volný elektronový pár kyslíku.

Van der Waalsova síla je velmi slabá vazebná interakce, která se projevuje např. elektrostatickými silami mezi okamžitými dipóly oscilací v molekulách.

V kyselém a zásaditém prostředí, kdy jsou antokyany ve formě **flavyliového kationu nebo anionické báze** (viz kap.4.3.1) lze také předpokládat možnost iontových interakcí. Z koloristického pohledu je lze tedy považovat za **barviva přímá** (substantivní) a za určitých podmínek i za barviva **kyselá a kationická**.

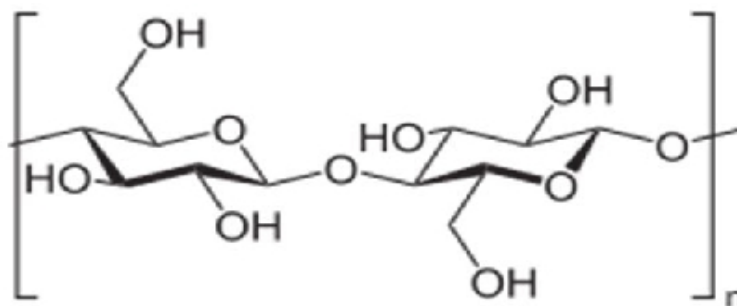
8.3 Vlákná vhodná pro barvení antokyany

Aby došlo k obarvení vlákna barvivem, musí mít barvivo dostatečnou afinitu k textilnímu substrátu. Afinita (příbuznost) vyjadřuje ochotu barviva reagovat s textilním substrátem, z čehož vyplývá, že závisí především na chemických vlastnostech antokyanů a fyzikálně-chemických vlastnostech povrchu vláken.

Pro barvení antokyany se jako nejvhodnější substrát jeví přírodní hydrofilní vlákna. U nás nejběžněji používanými přírodními vlákny jsou bavlna a vlna.

8.3.1 Bavlna

Bavlna je rostlinné vlákno, jehož základ tvoří celulóza - vláknitý polymer (polysacharid) tvořený z několika tisíc monomerních jednotek β -glukózy, které jsou pospojované 1,4-glykosidickými vazbami. (Obr.20) Disacharidem je celobióza.



Obr.20 Celulóza [1]

Celulóza obsahuje především alkoholické (hydroxylové) skupiny, které jsou zodpovědné za většinu jejích interakcí. Dochází mezi nimi ke tvorbě vodíkových můstků a tím ke vzniku intramolekulárních vazeb (vodík. můstky mezi -OH skupinami téže molekuly), a dále intermolekulárních vazeb (mezi -OH skupinami sousedních

molekul). Tyto interakce jsou zodpovědné za tuhost makromolekul a nerozpustnost celulózy ve vodě. Takto jsou tvořena **krystalická místa**, která tvoří až 70 % uspořádání celulóзовých vláken.

Zbylých 30 % je tvořeno **amorfními místy**, ve kterých se necházejí volné -OH skupiny - tedy v podstatě jediné hydroxyly volně přístupné chemickým interakcím s barvicí lázní. Jen tato místa mají schopnost poutat molekuly vody (dochází k bobtnání) a substantivní barvivo. Bavlna je tedy málo reaktivní látka.

V silně **kyselém prostředí** dochází k poškozování bavlny, a to především k hydrolytickému štěpení glykosidických vazeb, při kterém se snižuje polymerační stupeň a tedy i pevnost bavlny (**hydrocelulóza**). V přerušených místech vznikají aldehydické skupiny, na jejichž snadné oxidaci jsou založeny testy na důkaz poškození bavlny.

Oxidační činidla atakují nejprve primární alkoholové skupiny na aldehydy až karboxyly, teprve silnější oxidace přemění i sekundární alkoholy na ketony a následně dojde k rozštěpení glukopyranózového cyklu (**oxycelulóza**). Následkem je opět snížení pevnosti bavlny.

Zásaditému prostředí odolává bavlna lépe než kyselému, i když se v něm částečně rozpouští. S rostoucím pH roztoku dochází nejprve spíše k fyzikálním změnám. V amorfních oblastech vlákna dochází k přerušení vodíkových můstků, do vzniklých „mezer“ se natlačí molekuly vody a vlákno **bobtná**. Při vyšší koncentraci zásady získává celulóza **záporný náboj**, vzniká **alkalicelulóza** a hydratovaná celulóza.

[51] [52]

8.3.2 Vlna

Vlna je živočišné vlákno, jehož základem je vláknitá bílkovina **keratin**. Tento živočišný polymer je tvořen z monomerů - aminokyselin, které jsou pospojovány **peptidickými vazbami** (- CO-NH-). Posloupnost aminokyselin určuje **primární strukturu** keratinu.

Sekundární struktura vzniká v důsledku tvorby vodíkových můstků mezi vodíky aminoskupin a karbonylovými či karboxylovými kyslíky, kdy molekula zaujímá určitou prostorovou konformaci. V případě vláknité bílkoviny takto vzniká např. struktura skládaného listu nebo konformace α -helix (šroubovice).

Terciární a kvartérní struktura keratinu vzniká v důsledku interakcí funkčních skupin v molekule, které se dostávají do interakcí vlivem spirálového stočení řetězce, jejichž výsledkem je určité prostorové uspořádání a chování keratinu.

Vzhledem k rozmanitosti primární struktury (směs α -aminokyselin) obsahuje vlna nejrozumnější chemické skupiny. Aminokyseliny jsou pospojovány peptidickými vazbami, které vznikají kondenzací aminoskupin a karboxylových skupin aminokyselin. Jednotlivé peptidické řetězce jsou navzájem pospojovány vodíkovými můstky, solnými můstky mezi disociovanými karboxyly a protonizovanými aminoskupinami), disulfidickými (cystinovými) můstky (síra je obsažena v aminokyselině cystinu, cysteinu a methioninu), ve struktuře vláken je obsažen fenol (aminokyselina tyrosin), imidazol (aminokyselina histidin) a indol (aminokyselina tryptofan), kationické a anionické aminokyseliny.

Tato **chemická rozmanitost** dělá z vlny poměrně reaktivní a reakcím s barvivou přístupný substrát.

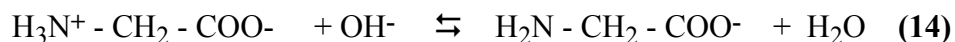
Vlna snáší kyselé prostředí lépe než zásadité. Díky obsahu karboxylů i aminoskupin má vlna určitou pufrací schopnost a v určitém rozmezí pH (3,4 - 4,5), kdy je počet disociovaných karboxylových skupin a aminoskupin v rovnováze, vykazuje vlna nejvyšší stabilitu. Vlna se nachází v **izoelektrickém stavu**, kdy mezi povrchem proteinu a kapalnou fází není žádný potenciální rozdíl, vlna nemá navenek žádný elektrický náboj.

Izoiontový bod s pH 4,9 představuje bod s maximální chemickou a mechanickou stabilitou.

S klesajícím pH lázně, tedy s přibývajícími ionty v roztoku, se potlačuje disociace karboxylových skupin a dochází k protonizaci vlny. **(13)**

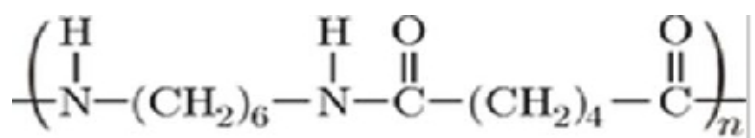


Naopak v zásaditém prostředí se potlačuje náboj na aminoskupině a vlna se nabíjí záporně. **(14)**



Alkalické prostředí vlnu poškozuje mnohem více než kyselé, a to v závislosti na teplotě. Při pH 10 nesmí teplota překročit 50 °C, při pH 13 se vlna poškodí již za studena. V alkalickém prostředí se při vyšší teplotě vlna rychle rozpouští, štěpí se peptidické vazby a disulfidické (cystinové) můstky. [51] [52]

Ze syntetických vláken by pro barvení antokyany mohla připadat v úvahu vlákna polyamidová. **Polyamid 6** vzniká polymerací kaprolaktamu, **polyamid 6.6** (Obr.21) polykondenzací hexametylendiaminu a kyseliny adipové. Obsahují peptidickou vazbu podobně jako vlna, navíc jednotlivé řetězce jsou ukončeny volnými karboxylovými skupinami a obsahují i volné aminoskupiny. To jsou sice místa, která by připadala v úvahu pro navázání barviva, ale vzhledem k tomu, že jich je oproti vlně značně méně, dá se předpokládat vybarvení slabší než u vlny.

$$\left(\begin{array}{c} \text{H} \qquad \text{O} \\ | \qquad || \\ \text{---N---(CH}_2\text{)}_5\text{---C} \end{array} \right)_n$$


- 47 -

8.4 Různé aspekty barvení vláken antokyany

K barvení textilií antokyany je možné použít různě zředěné či zahuštěné šťávy získané buď přímo z rostlin lisováním nebo na odšťavovači, případně extrakcí s horkou vodou (např. v případě suchých slupek, listů, květů nebo plodů, též u ovoce či zeleniny s malým přirozeným obsahem vody). S ohledem na substrát neuvažujeme extrakci antokyanů organickými rozpouštědly.

Vzhledem k odlišnému chování antokyanů při různém pH je možné předpokládat i odlišnosti při barvení v různě kyselé lázni, s přihlédnutím k povaze barveného substrátu.

Afinita přírodních barviv k vláknům je ve srovnání se syntetickými barvivami obecně velmi nízká, na intenzitu vybarvení má dále vliv koncentrace barviva, délka lázně (poměr lázně a hmotnosti barveného substrátu), doba barvení, teplota, pH, velikost molekul barviva, disociace molekul barviva, substrátu a jejich vzájemný poměr, atd.

U barvení přírodními barvivami je obecným problémem vysoká spotřeba barviva na hmotnost barveného substrátu. Uvádí se, že k vybarvení syntetickým barvivem na středně sytý odstín je potřeba barviva kolem 1% z hmotnosti barvených vláken, u rostlinných barviv je to kolem 10%. Na tmavý odstín 5-7% syntetického vybarvení činí potřeba přírodního barviva až čtvrtinu hmotnosti z hmotnosti vláken. [53]

S nízkou afinitou přírodních barviv k vláknům souvisí i **nízké procento vytažení** barviva z lázně a následně i horší stálosti. Při barvení syntetickými barvivami je samozřejmostí snaha o maximální vytažení barviva z lázně- z důvodů ekonomických i ekologických. Ideálem je 100% vyčerpání lázně, kterému se některé barvicí systémy skutečně přibližují (barvení akrylových vláken kationickými barvivami). Intenzivní výzkum v oblasti reaktivních barviv se snaží minimalizovat katastrofální, leckdy až 50% ztráty barviva, které zůstává po barvení nevyužito a chemicky znehodnoceno v lázni. Takovéto a ještě nižší hodnoty vytažení barviva z lázně jsou však u přírodních barviv běžné, některá málo afinná přírodní barviva jako např. žlutý kvercetin dosahují vytažení z lázně jen asi 10% [53], ovšem barvivo po barvení znehodnocené není, proto je možné používat lázně opakovaně, jako tzv. barvení na staré lázni, kdy se dosáhne světlejších odstínů anebo se lázeň doplňuje.

Experimentálně lze procento vytažení barviva z lázně (%E) stanovit proměřováním absorbancí původní lázně a zbytkové lázně po barvení. [54]

Jde o stanovení relativní koncentrace lázně vztažené k výchozí (100%) barvicí lázni, nestanovuje se koncentrace absolutní (např. v gramech /litr), proto není potřeba počítat s absorpčními (extinkčními) koeficienty. Pokud měření probíhá na stejné optické dráze, tj. ve stejné kyvetě a s patřičným zředěním lázni tak, aby absorbance nepřesahovaly linearitu Lambert-Beerova zákona (tj. $A < 1$), procento vytažení se vypočítá podle vzorců:

$$\% L = (A_Z \cdot Z_Z / A_0 \cdot Z_0) \cdot 100 \quad (15)$$

$$\% E = 100 - \% L \quad (16)$$

$\% L$ procento barviva zbylého v lázni

A_Z, A_0 absorbance zbytkové a původní lázně

Z_Z, Z_0 ředění zbytkové a původní lázně

$\% E$ procento vytažení lázně

I v případě antokyanů není samotná **koncentrace** vlastního **barviva** v lázni u rostlinné šťávy (natož rozředěného extraktu) nijak závratná, pohybuje se v miligramech na litr surové rostlinné šťávy, přesto vzhledem k dobré rozpustnosti antokyanů ve vodě a k poměrně vysokému absorpčnímu koeficientu antokyanů lze především při barvení vlny a polyamidu v kyselém prostředí očekávat dosažení slušné sytosti vybarvení.

Je třeba počítat s tím, že takto z různých rostlin získané barvicí lázně se budou značně lišit obsahem antokyanů a že pro případná srovnání jednotlivých vybarvení je potřeba tyto lázně určitým způsobem kvantifikovat a také vzít v úvahu ředění vzniklé případnou extrakcí vodou či jiným médiem.

Pro barvení textilií antokyanů se jako nejvhodnější jeví barvení **láznovým způsobem**, při časově teplotním režimu podobném jako je běžné při barvení jinými přímými barvivy, tj. barvení v délce do 1 hodiny (vzhledem k termolabilitě antokyanů při vyšším pH raději kratší), při postupném zvyšování teploty až k 90 - 95 °C.

U substantivního barvení se spoléháme v podstatě jen na vodíkové vazby a Van der Waalsovy síly jako na jediné vazebné interakce mezi barvivem a substrátem, což jsou interakce ve srovnání s kovalentní nebo iontovou vazbou slabé.

Alkalické prostředí zvyšuje rozpustnost přímých barviv. S rostoucím pH se zvyšuje disociace antokyanů, což se projevuje jejich záporným nábojem (viz anion chinoidní báze), naopak velmi nízké pH umožňuje protonizaci flavanového skeletu na flavyliový kationt.

Je nutno počítat s těmito **odpudivými elektrostatickými silami**, které působí mezi povrchem (především celulóзовého) vlákna a barvivem, protože znesnadňují sorpci barviva a snižují vytažení barviva z lázně. Naopak v oblasti izoelektrického bodu vlny, který se u různých antokyanů neurčitě překrývá s přechodem z kationické flavyliové do neutrální chinoidní formy antokyanu, by tyto iontové interakce mohly mít spíše zesilující účinek na množství vytaženého barviva.

U přímých barviv se odpudivé síly mezi povrchovým nábojem vlákna a nábojem barviva částečně řeší přidáním **neutrálního elektrolytu** (např. kuchyňská sůl). Tím se sice trochu omezí rozpustnost barviva, ale zároveň se elektrostatické odpudivé síly mezi barvivem a substrátem zmírní, dále se zvýší iontová síla roztoku a posune se disociační rovnováha celulózy ve smyslu potlačení disociace karboxylových skupin (jejich množství v „poškozené“ bavlně stoupá s bělením a další předúpravou) a tím se také trochu sníží záporný náboj celulózy.

Po adsorpci barviva z lázně na vlákno následuje nejpomalejší a tím také nejvíce určující faktor celého barvení, totiž **difuze barviva** do vlákna. Difuze je samovolné vyrovnávání koncentračních rozdílů (zde: koncentrace barviva v lázni a v nitru vlákna) vlivem samovolného chaotického pohybu molekul v kapalině nebo plynu (Brownův pohyb), který je výsledkem chaotických srážek částic. Závisí nejen na koncentračním spádu barviva, rychlost difuze barviva do vlákna roste s teplotou (ta však snižuje afinitu barviva k vláknu spojenou s počáteční adsorpcí na vlákno, kdy vyšší teplota naopak podporuje desorpci barviva z vlákna), určující je též velikost molekuly barviva, počet sorpčních míst ve vlákne (zde: v amorfni části vláken) a prostředí, ve kterém difuze probíhá (zde: orientace polymerních řetězců vlákna a velikost mezimolekulárních prostor, které vznikají v amorfni části polymerního řetězce při teplotě nad teplotou zesklenní T_g). [51] [55]

Vtipným zjednodušením tohoto procesu je tzv. „**Wienerův žížalkový model**“, ve kterém polymerní řetězce vlákna představuje klubko žížal, jejichž chaotický pohyb s teplotou vzroste. Molekula chaoticky se pohybujícího barviva je přirovnána k nebohému mravencovi, který se do takového klubka dostane, je v něm pohlcen a po snížení teploty, která žížaly opět znehybní (ve vlákně je to teplota pod hodnotou T_g), v hloubi klubka beznadějně uvězněn. Uniknout se mu podaří jen v případě, že se nedostal příliš hluboko během předchozího pohybu žížal (tedy analogie se snadnou desorpcí jen povrchově ulpělého barviva na vlákně a špatnou stálostí vybarvení).

Pro co nejlepší vybarvení - tedy maximální adsorpci barviva na vlákno (avšak nikoliv příliš rychlou, protože ta je příčinou neegálního vybarvení) a následně co nejhlubší probarvení vláken se proto při láznovém barvení přímými barvivy (tedy analogicky i pro antokyany) volí pro počáteční smočení textilie v barvicí lázni nižší teplota (adsorpce barviva na vlákno), respektive její pomalý růst až k bodu varu (zamezení lokalizovaným adsorpcím- neegalitám), setrvání při vyšší teplotě cca 30 minut (rozvolnění polymerních řetězců vlákna a urychlení difuze barviva do nitra vlákna) a následné pomalé chladnutí (migrační vyrovnávání koncentračních rozdílů barviva- neegalit, přiblížení se ke stavu chemické rovnováhy).

8.5 Stálosti vybarvení textilií antokyany

Stálost vybarvení je schopnost barviv odolávat fyzikálním a chemickým vlivům prostředí. Závisí na vlastnostech barviva, textilního substrátu i na technologii barvení. Špatná stálost vede k nežádoucí změně sytosti nebo odstínu barvy.

U barviv tak citlivých na změny pH, jako jsou antokyany, je nutné počítat s **nestabilním odstínem vybarvení** - textilie barvená antokyany v kyselém či zásaditém prostředí změni opět barvu při oplachu nebo nejbližším praní odlišně kyselou (i neutrální) lázní.

Stálosti v praní, potu a otěru budou souviset s hloubkou probarvení vláken, stálost na světle obecně souvisí nejen se samotným chemismem barviva a jeho schopnostech odolat náporu fotonů o vyšší energii, ale také s množstvím barviva na vlákně, tedy se sytostí odstínu.

8.5.1 Stálost na světle

Příčinou barevných změn je fotokatalýza barviv, kdy dochází k interakci barviva s vysokoenergetickým UV zářením, které vede k destrukci barviva. Vysoce energetické fotony vyrážejí z molekul barviva elektrony a změni je na reaktivní radikály. Ty snadno reagují s okolními molekulami- barviva, substrátu nebo s kyslíkem a vodou- za vzniku dalších reaktivních zplodin. Rozkladné reakce jsou provázeny barevnými změnami a poklesem intenzity vybarvení.

Obecně- světlejší odstíny jsou poškozeny (změna odstínu nebo úplné odbarvení) mnohem dříve a snadněji než tmavá vybarvení. Světelnému rozkladu více odolávají agregáty molekul barviva, takže sytější vybarvení jsou vůči světlu odolnější.

Stálosti na světle se testují buď na světle denním (dle normy ČSN 80 0132), kdy se vzorky vystavují k jihu pod úhlem 45°. Na letním slunci se projeví změny u stupně 1 již po několika hodinách, u stupně 4 asi po týdnu a u stupně 7 až po několika letech. Jde o testování nejpřirozenější, avšak zdlouhavé a vzhledem k proměnlivosti podmínek také obtížněji kvantifikovatelné.

Zrychleným testem světlostálosti je testování tzv. **xenotestem**, kdy se testuje světlem umělým generovaným xenonovou výbojkou (dle normy ČSN 80 0147). Testuje se ve zvolené teplotě a vlhkosti a hodnotí se změny vybarvení. Neposuzuje se absolutní úbytek barviva, ale vzorek je ozařován spolu se standardem, který představuje tzv. **modrá stupnice**. Jde o osmistupňovou řadu modrých vybarvení na vlněné tkanině, kdy se vždy následující barvivo rozkládá 2x (nebo 4x) pomaleji než to předchozí.

K narušení stupně 1 dochází velmi rychle, stupeň 4 se naruší po 8-10 hodinách, stupeň 6 se rozloží v průběhu 2-4 dnů. Nejhorší stálost na světle tedy představuje hodnota 1, stupeň 6-7 představuje vynikající úroveň stálosti na světle. [51]

8.5.2 Stálost v praní

Stálost v praní patří mezi tzv. mokré stálosti (dále je to např. stálost v potu, stálost ve vodě, stálost v přebarvování atd.). Je prováděna dle normy ČSN 80 0143 a testuje se tzv. **sdrúžený vzorek** - prošíty vzorek 10 x 4 cm složený ze 3 tkanin: 1.doprovodná neobarvená tkanina (ze stejných vláken jako zkoušená barevná tkanina), uprostřed je testovaná barevná tkanina a dále 2.doprovodná neobarvená tkanina definovaná normou (nejčastěji vlna pro testovanou bavlnu a naopak).

Sdružený vzorek se vkládá do rotačních patronových aparátů a pere se v různých termostatovaných vodních lázních (40 - 95 °C), s přídavkem anionického pracího prostředku o koncentraci 4 g/litr, bez optického zjasňovače. Pro zintenzivnění praní se přidávají ocelové kuličky (neplatí pro vlnu a hedvábí). Pere se 30 nebo 45 minut v neutrální nebo alkalické lázni (pH 10,5 nastaveno sodou). Po odděleném sušení se subjektivně hodnotí výsledek změny barvy barvené textilie a zároveň zapouštění na doprovodné tkaniny podle pětistupňové šedé stupnice (5 - nejstálější, 1-nejhorší stálost), případně se uvádějí i odstínové změny. [51]

8.6 Objektivní hodnocení barevnosti textilií

8.6.1 Barevný prostor CIE-Lab

K objektivnímu posuzování barevných odchylek se barvy umísťují do virtuálního prostoru, ve kterém vzdálenost 2 barevných bodů odpovídá vizuálně vnímané barevné odchylce. Toto pojetí sebou ale už v základu nese závažný problém - pokoušíme se přesně definovat a pokud možno přesně matematicky vyjádřit detekci barvy lidským okem, tedy veličinu do jisté míry subjektivní a u každého člověka i objektivně odlišnou! Připusťme však jistou jednotnost vnímání barev lidským druhem, pak ale stejně vlivem fyziologicky odlišné citlivosti lidského oka na různé barvy (lidské oko vnímá citlivěji odchylky v modrých odstínech než v zelených) je tvar tohoto virtuálního barevného prostoru nepravidelný a proto jeho složitý vývoj pokračuje dosud.

Z konvenčních důvodů je oficiálně akceptován systém CIE-Lab přijatý komisí **CIE** (Commission internationale de l'éclairage, Mezinárodní komise pro osvětlování), která pro definování barev vyvinula ve 30.letech kolorimetrický prostor XYZ. Ten byl transformací RGB systému do nových virtuálních souřadnic (vjem každé barvy lze vyjádřit pomocí RGB barev a příslušných faktorů- trichromatických členitelů).

Konvenčně akceptovaný prostor CIE-Lab je převodem XYZ hodnot kolorimetrického prostoru do kartézských souřadnic, kde barevná odchylka (= vzdálenost dvou barev v tomto prostoru) = odmocnina ze součtu čtverců rozdílů předlohy a vzorku v souřadnicích ve směru x,y a z. **(17)** [51] [56]

V prostoru Lab tyto souřadnice představují osy **L** (jas, bílá=100, černá=0), **a** (+ představuje posun na ose k červené barvě, - k zelené), **b** (+ představuje posun ke žluté barvě, - k modré).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

(17)

ΔE odstínová odchylka (celková barevná difference)

ΔL odchylka jasu (černá/bílá)

Δa posun na ose červená/zelená

Δb posun na ose žlutá/modrá v barevném prostoru CIE-Lab

8.6.2 Měření barevnosti textilií

V předchozích kapitolách byla řešena analýza různě barevných látek v roztocích, kdy byla ke zjištění jejich koncentrací proměřována absorbance v absorpčních maximech typických vlnových délek s využitím Lambert-Beerova zákona. Jak ale měřit barevnost materiálu, jímž světlo neprochází jako roztokem a přitom využít tuto jednoduchou lineární závislost růstu barevnosti na koncentraci barviva v materiálu?

Takovým homogenním nekonečným poloprostorem, který je vlastně analogií nekonečné vrstvy roztoku, je i textilie, na které dochází po dopadu světla ke dvou zásadním jevům: **část světla je rozptýlena a pohlcena, část odražena**. (U tenkých tkanin pochopitelně i část světla prochází skrz tkaninu, to však neuvažujme a tuto část světla eliminujme proměřením násobné vrstvy tenké textilie).

Na měření barevnosti textilií byl aplikován výzkum v měření barevnosti papíru, který prováděli a publikovali ve 30.letech Paul Kubelka a Franz Munk.

Pro systémy, u kterých je více než 50% dopadajícího světla odraženo a méně než 20% dopadajícího světla prochází skrz materiál, definovali vztah známý jako **Kubelka-Munkova rovnice**, který lze aplikovat i na textilie: [57]

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R)^2}{2 * R}$$

(18)

K absorpční koeficient

A rozptylový koeficient

R stupeň remise (1= absolutní odraz, 0= absolutní pohlcení světla určité vlnové délky)

Podíl koeficientů K/S je lineárně závislý na koncentraci barviva ve vlákne a proto je vlastně paralelou Lambert-Beerova zákona, který platí pro roztoky:

$$K/S = k * c \quad (19)$$

k experimentálně zjištěná konstanta [g/mol]

c koncentrace barviva ve vlákne [mol/g] [51]

Podobně jako u Lambert-Beerova zákona je vztah použitelný především pro světlá vybarvení textilií, u středních a tmavších vybarvení se projevují odchylky od linearity.

Navíc je výpočet zatížen strukturou a původní vlastní barvou barveného substrátu (nebarvíme přeci naprosto bezbarvou textilií!) a je nutné odečítat K/S hodnotu neobarvené textilie od K/S hodnoty textilie obarvené.

8.6.3 Remisní spektrofotometrie - kolorimetrie

To, co naše oči registrují jako určitou barvu předmětu, je důsledkem selektivní absorpce vybraných oblastí vlnových délek viditelného světla daným předmětem. Na bílém (polychromatickém) světle se nám pak takový předmět jeví zbarvený tzv. doplňkovou barvou, tedy světlem, které předmět do okolí - tedy i do našich receptorů na oční sítnici - odráží a v jehož spektru chybí jím absorbované vlnové délky. Doplňkové barvy (remitovaná/absorbovaná) jsou vyjádřeny v tzv. **diagramu chromacity** (Obr.22), zjednodušeně jde o dvojice červená/zelená a modrá (fialová)/ oranžová (žlutá).



Obr.22 Diagram chromacity [1]

Při měření barevnosti a barevných odchylek textilních materiálů měříme tedy světlo, které se od textilie odráží. K tomu se používají kolorimetrické přístroje- **remisní spektrofotometry**. Registrují odraz záření jednotlivých vlnových délek celého spektra viditelného záření, tj. od 380 do 760 nm a dávají nám informaci o barevných souřadnicích v prostoru XYZ či CIE-Lab.

Grafickým vyjádřením barevnosti odrazivého povrchu jsou tzv. **remisní křivky**. Remisní křivka znázorňuje množství záření jednotlivých vlnových délek, které se odráží od barevného povrchu. [25]

Spektrum barevných povrchů tedy vypadá zcela jinak, než je tomu u spekter absorpčních - např. maximální remise vlnové délky 510 nm představuje zelenou barvu odraženého světla (doplňková barva k červené, srovnej s absorpčním maximem červených flavyliových solí při vlnové délce kolem 510 nm), maximální remise v oblasti 600-700 nm představuje žluté odražené světlo (doplňková barva k modré, srovnej s absorpčním maximem modře zbarvených roztoků kolem 765 nm při stanovování polyfenolů), maximální remise v oblasti pod 500 nm přísluší modrému světlu (viz oblast absorpčního spektra žluté až oranžové barvy) atd. Výška vrcholu remisní křivky udává procento odrazivosti v příslušném spektrálním pásmu, tedy relativní světlost barvy (relativní jas).

Objektivním proměřením remisí barevné tkaniny na remisním spektrofotometru (např. Datacolor, Minolta) tak můžeme hodnotit barevnost i barevné odchylky textilie, protože výstupem jsou buď hodnoty XYZ nebo tyto hodnoty přepočítané na hodnoty barevného prostoru CIE-Lab. Výpočet odstínové odchylky ΔE se provádí z naměřených hodnot L, a, b předlohy a vzorku. (17)

Pokud chceme provést srovnání se subjektivním hodnocením barevných odchylek podle tzv. šedé stupnice (viz kapit. 8.5.2), potom jednotlivým stálостním stupňům šedé stupnice odpovídají ΔE hodnoty dle Tab.3.

STUPEŇ ŠEDÉ STUPNICE GSR	ODSTÍNOVÁ ODCHYLKA ΔE (CIELAB)
5	0 - 0,40
4 - 5	0,41 - 1,25
4	1,26 - 2,10
3 - 4	2,11 - 2,95
3	2,96 - 4,10
2 - 3	4,11 - 5,80
2	5,81 - 8,20
1 - 2	8,21 - 11,60
1	>11,6

Tab.3 Odstínové změny v hodnotách šedé stupnice a odstínových odchylek CIELAB [51]

II. Experimentální část:

1. Proměření absorpčních spekter některých antokyanů

Chemikálie: Kyselina citronová, kyselina octová, HCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, KCl, H₃BO₃, NaOH, octan sodný, NaOH, Na₂CO₃, destilovaná voda.

Pomůcky: kádinky, lžička, uzavíratelné skleněné nádoby, pipety, mikropipety, laboratorní váhy, spektrofotometr, pH-metr.

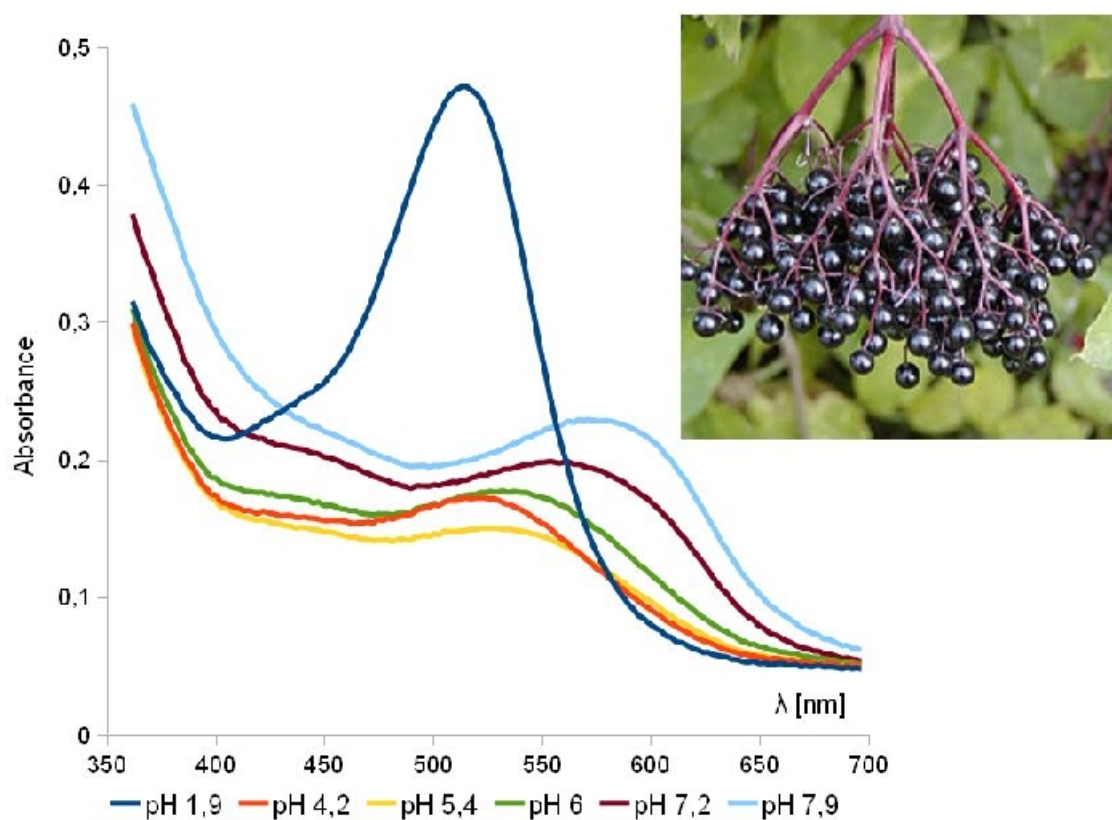
Podle chemických tabulek [58] byla připravena řada tlumivých roztoků (KCl/HCl, citrátový, fosfátový, octanový a boritanový pufr) a roztoků (za použití uhličitanu sodného a hydroxidu sodného) s rostoucí hodnotou pH od 1 do 13 (1 - 1,9 - 4,2 - 5,4 - 6 - 7,2 - 7,9 - 8,8 - 10 - 11 - 12 - 13).

Rostlinný materiál (čerstvé plody černého bezu, červené zelí, plody brusnice borůvky) byl odšťaven na odšťavovači a takto získaná surová šťáva byla používána čerstvá, zavařená nebo zmražená pro další měření. Výjimkou bylo tmavé hroznové víno, ze kterého byly k měřením použity jen slupky. Ty byly vysušeny při teplotě do 50 °C a antokyany z nich extrahovány varem po dobu cca 30 minut.

K spektrofotometrickým měřením byly všechny šťávy vždy přefiltrovány, aby neobsahovaly zákal.

Malé množství filtrátu bylo mikropipetami (50, 200 a 500 µl) dávkováno a ředěno v 10 ml baňkách příslušným pufrům tak, aby absorbance nepřesahovaly hodnotu 1 a roztoky byly proměřovány na absorpčním spektrofotometru v oblasti viditelného světla (360 - 760 nm).

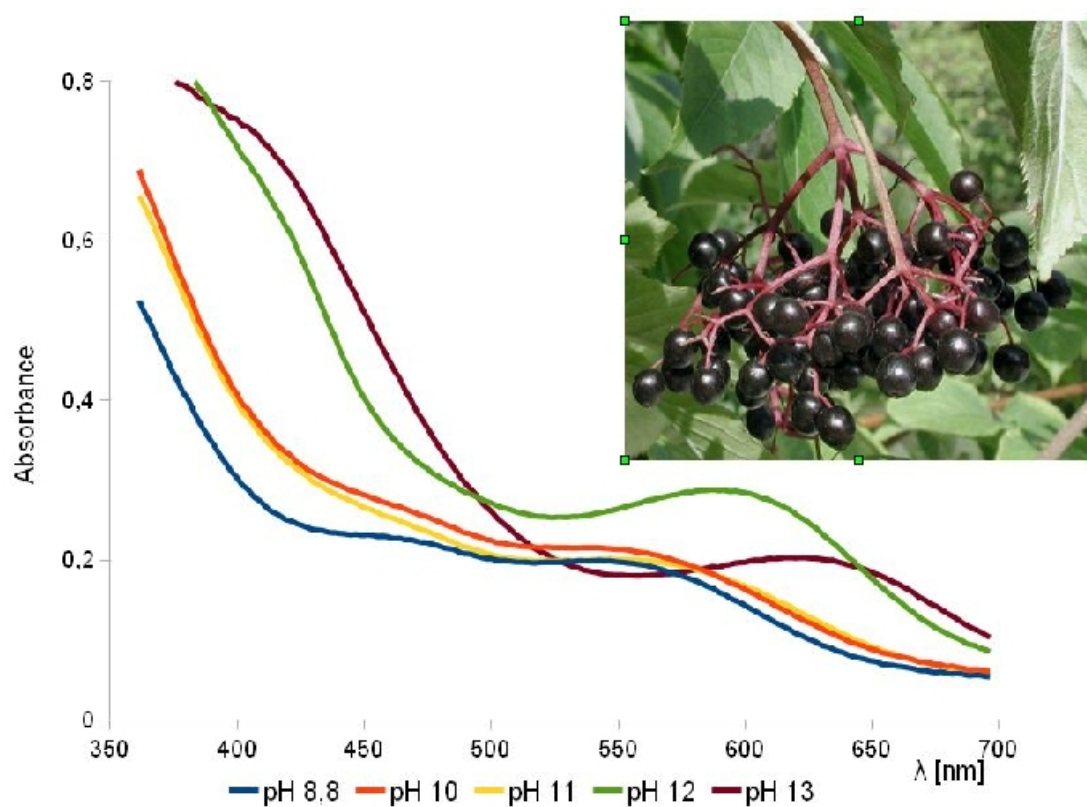
Výsledky:



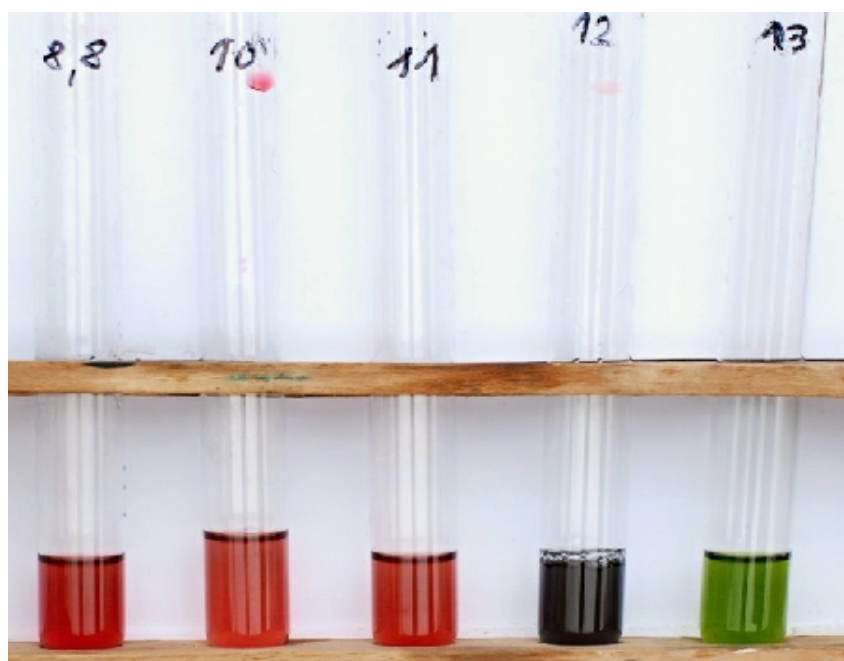
Obr.23 Černý bez, pH 1,9 - 7,9, absorpční spektra



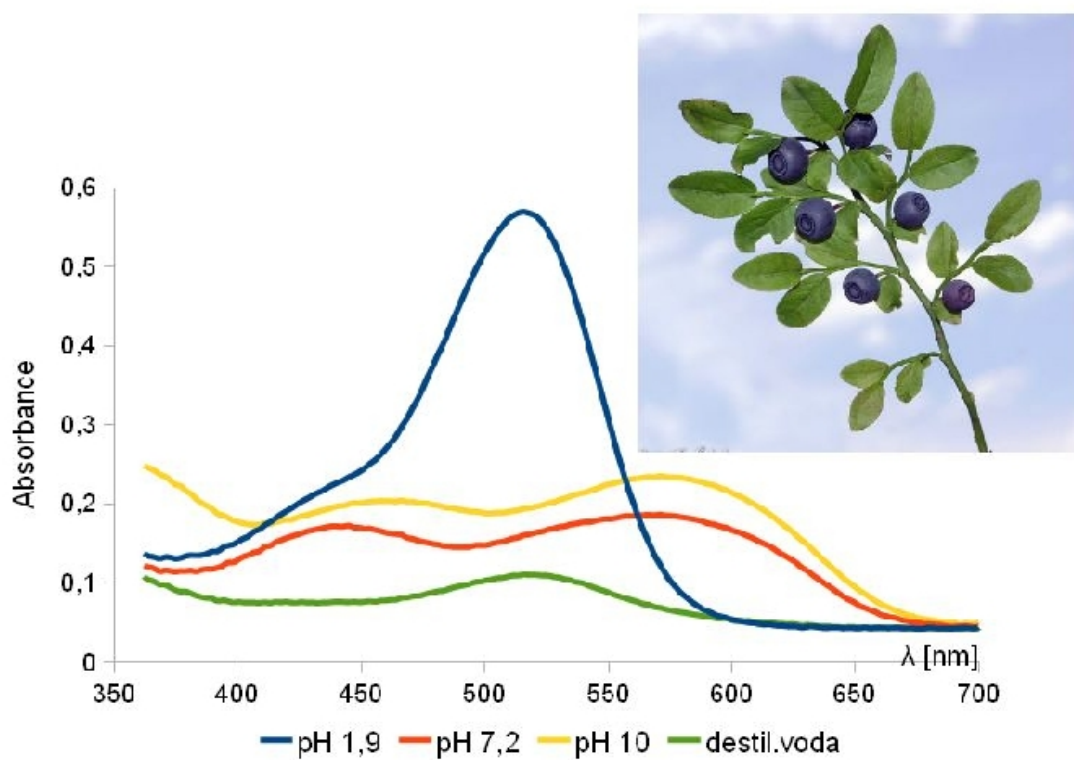
Obr.24 Černý bez, pH 1,9 - 7,9, roztoky



Obr.25 Černý bez, pH 8,8 - 13, absorpční spektra



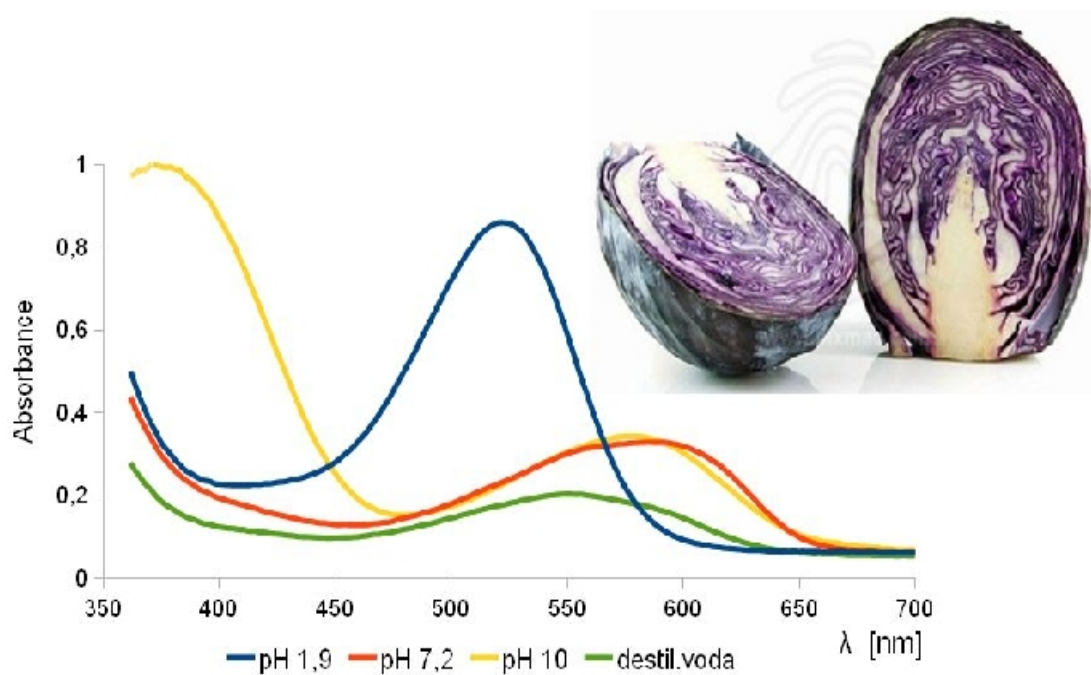
Obr.26 Černý bez, pH 8,8 - 13, roztoky



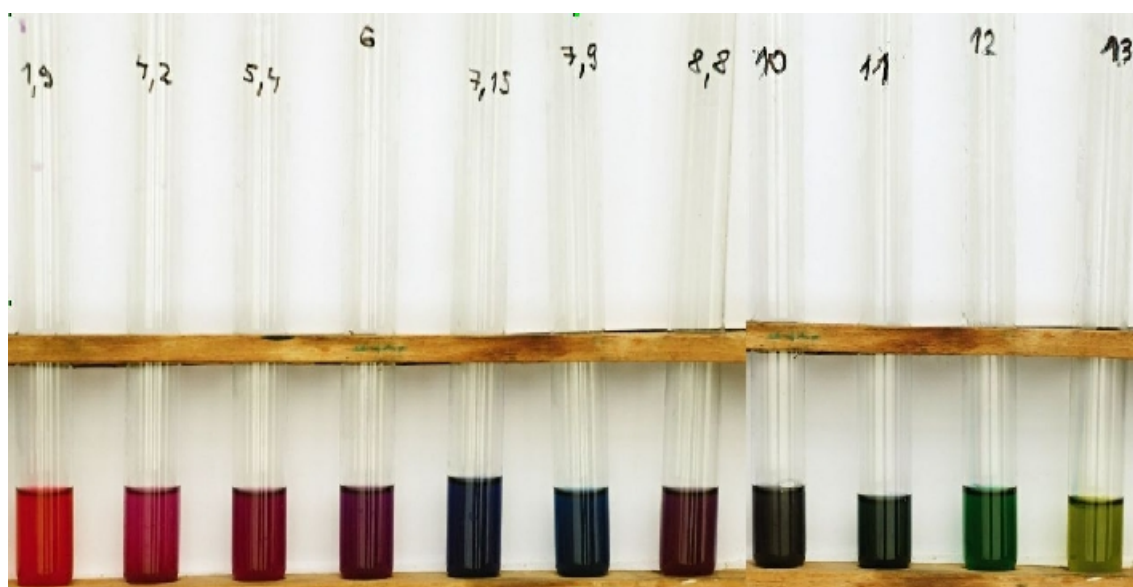
Obr.27 Borůvka, vybraná absorpční spektra



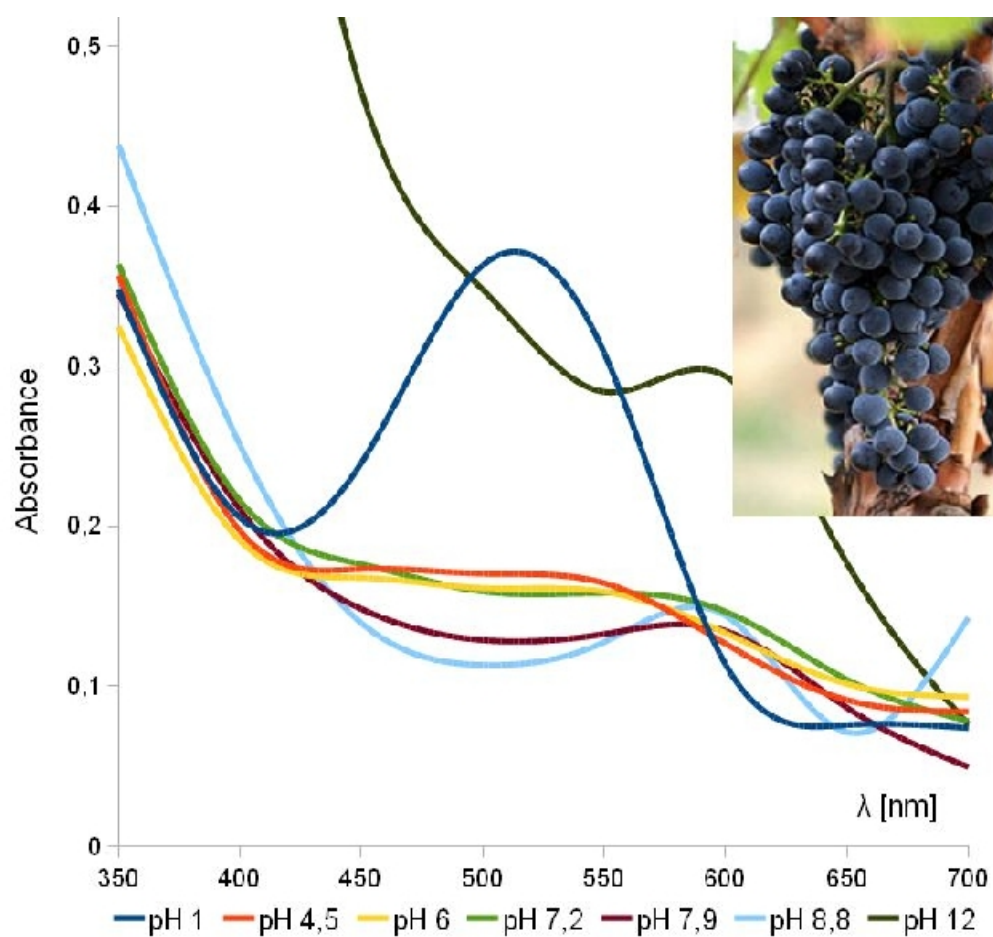
Obr.28 Borůvka, pH 1 -12, roztoky



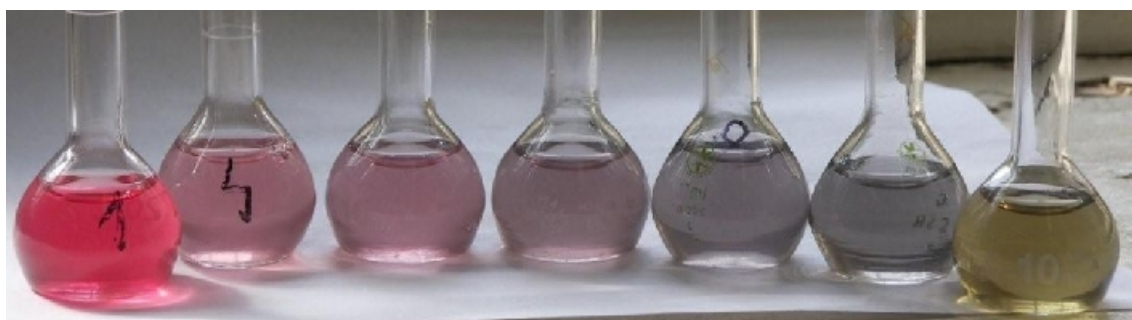
Obr.29 Červené zelí, vybraná absorpční spektra



Obr.30 Červené zelí, roztoky



Obr.31 Tmavé vinné hrozny, absorpční spektra



Obr.32 Tmavé vinné hrozny, roztoky pH 1 - 4,2 - 6 - 7,2 - 7,9 - 8,8 - 12

Diskuze:

Při objasnění změn, ke kterým dochází v aglykonech antokyanů v různě kyselém prostředí, vyjdeme ze stavu neutrální chinoidní báze. (Viz kap. 4.3.1, Obr.13)

V kyselém prostředí, tedy prostředí s přebytkem H^+ iontů, je chinon těmito ionty atakován a dochází k jeho změně na alkoholovou skupinu. Elektronově nejchudší místo v celém systému je díky elektronegativitě pyranového kyslíku v sousedství tohoto kyslíku na uhlíku C2, a tak OH^- ionty z vodného roztoku směřují sem- dojde vlastně k adici vody a vzniká velmi nestabilní karbinolová pseudobáze. Konjugovaný systém dvojných vazeb je zcela přerušen, dochází ke ztrátě barevnosti. (Při reálném měření antokyanu však často jen k poklesu barevnosti).

Dalším působením H^+ iontů (tedy snižováním pH) dojde k odnětí této naadované OH^- skupiny (jde o nestabilní místo, terciární alkoholovou skupinu, která se snadno odštěpí). Pyranový kyslík v C kruhu poskytne jeden svůj nevazebný elektronový pár do vazby s tímto sousedním uhlíkem, proto je v tomto stavu na pyranovém kyslíku lokalizován kladný náboj, vzniká tedy O^+ .

Kladný náboj pyranového kyslíku je kompenzován interakcí s jeho dalším nevazebným elektronovým párem a tím je propojen konjugovaný systém kruhů A, B i C, dochází k silnému nárůstu absorpance a hypsochromnímu posunu (stav stabilního jasně červeného flavyliového kationtu).

V zásaditém prostředí, tj. prostředí s nedostatkem H^+ iontů, OH^- skupiny vzniklé disociací vody atakují nejkyselejší vodík aglykonu, což je vodík OH^- skupiny nejvzdálenější od chinonu (v poloze C7 v A cyklu flavanu) a vznikne fenolát (aniont chinoidní báze). Konjugovaný systém zůstává zachován, absorpance se opět zvýší, dochází k bathochromnímu posunu. Tento přechod je vlivem dalších substituentů u jednotlivých antokyanů různý, např. u červeného zelí dochází ke vzniku modrého fenolátu mnohem dřív (už při velmi mírně zásaditém pH) než u černého bezu, jehož antokyanový vodný roztok zůstává červený ještě i v silně zásaditém prostředí (pH 11).

K oxidativnímu rozkladu na žlutý chalkon začne docházet až při velmi vysokém pH, chinon se přemění na karbinol, dochází k rozštěpnutí celého systému v jeho nejslabším místě, konjugovaný systém zaniká, ztrácí se původní barevnost.

Vzniklá struktura je dost stabilní a návrat k původním konjugovaným strukturám je již obtížný, i když částečně tato konverze probíhá.

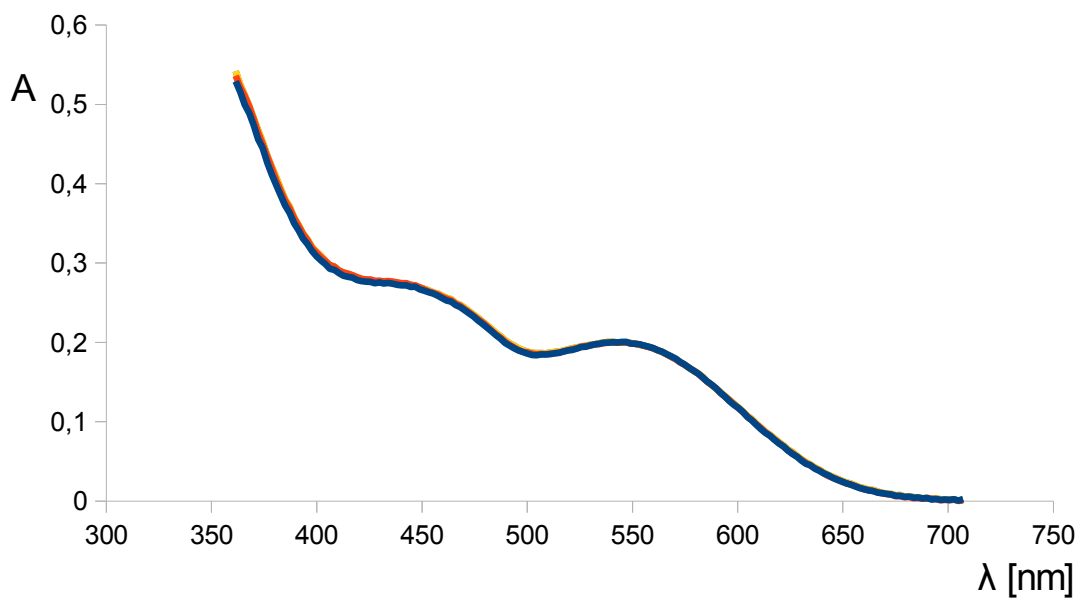
Chalkon se rozštěpením pyranového kruhu neodbarví zcela, protože ve zbylých dvou izolovaných aromatických kruzích je zachována konjugace dvojných vazeb. Vybudit tyto elektrony absorbovanými fotony už je ale obtížnější a zvládnou to jen fotony s vyšší energií, tj. v UV oblasti světla a do viditelné oblasti se promítnou jen okraje velmi intenzivních UV absorpčních pásů, které vyvolávají žluté zbarvení.

Závěr:

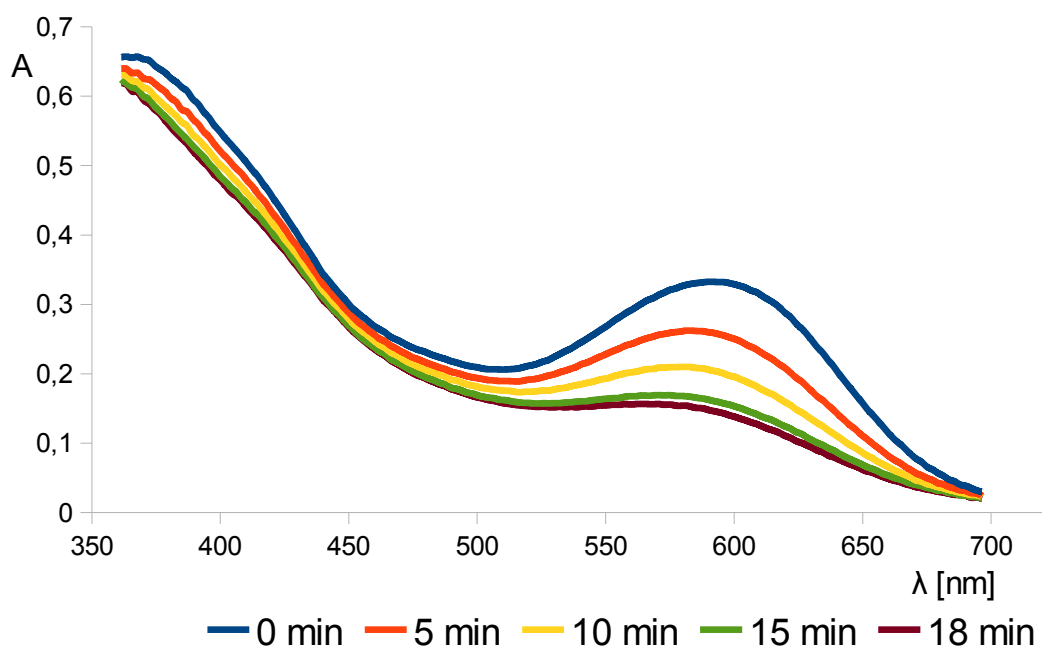
Byla proměřena absorpční spektra některých rostlinných šťáv obsahujících antokyany při různých hodnotách pH (červené zelí, černý bez, borůvka, vinná réva). Vzhledem k různému obsahu rozmanitých antokyanů se jejich barevné projevy v různě kyselém prostředí liší, přesto jsou všechny v silně kyselém prostředí výrazně červené-červenorůžové s typickým píkem a výrazným nárůstem absorbance v oblasti mezi 510 až 540 nm. Při hodnotách pH 4,5 - 6 dochází k poklesu barevnosti, oblast úplného odbarvení však nebyla zachycena u žádného z proměřovaných antokyanů.

Barevné přechody mezi flavyliovou formou a karbinolem probíhají velmi rychle, při vysokém pH, kdy již vzniká žlutý chalkon, je návrat k předchozímu stavu již pomalý a i přes silné okyselení vzniká jen zlomek původního červeného (růžového) vybarvení.

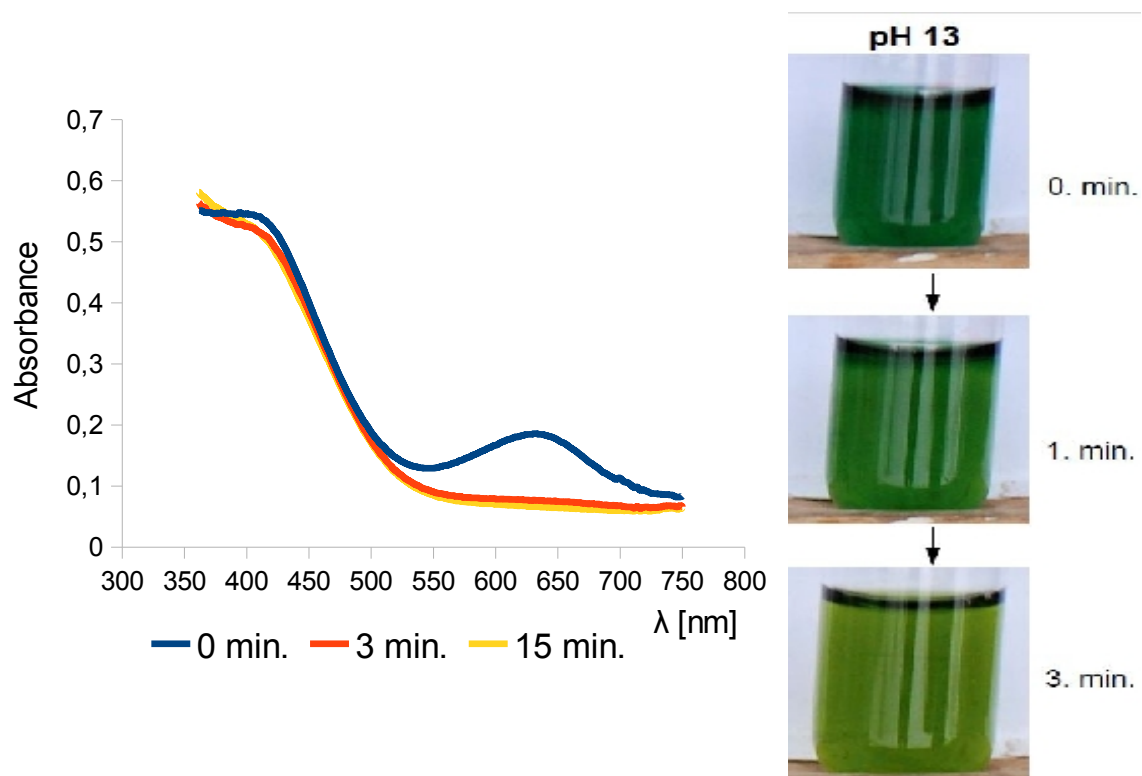
2. Měření nestability antokyanů v zásaditém prostředí



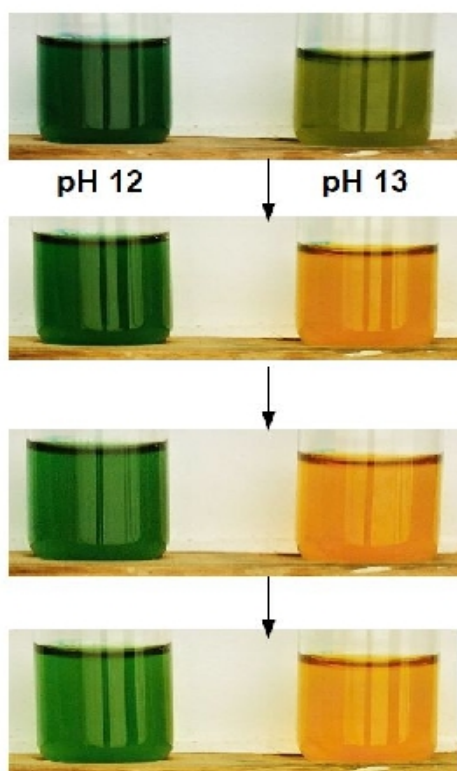
Obr.33 Černý bez, pH 10, beze změny v čase 0 - 25 minut



Obr.34 Černý bez, pH 12, změny během 20 minut



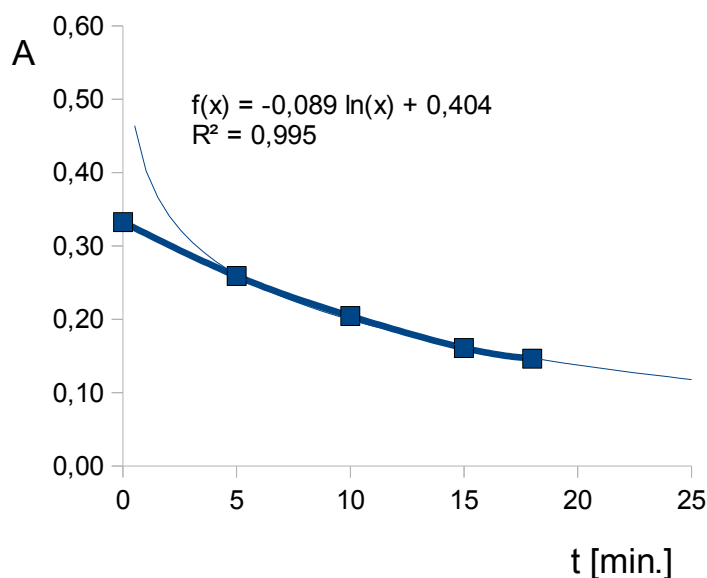
Obr.35 Černý bez, pH 13, rychlé změny



Obr.36 Červené zelí, změny při pH 12 a pH 13 v čase 0 - 5 minut

ČAS [min.]	Absorbance
0	(0,33)
5	0,2589
10	0,2043
15	0,1609
18	0,1464

Tab.4 Černý bez, pH 12, změny absorbance v čase



Obr.37 Černý bez, pH 12, průběh poklesu absorbance při λ 592 nm

Diskuze:

Degradace antokyanů v černém bezu při pH 12 (Tab.4, Obr.34 a 37) by mohla být řešena z pohledu chemické kinetiky jako chemická reakce 1.řádu. Ty probíhají rychlostí, která závisí na okamžité koncentraci spotřebovávané výchozí látky. Jde o rychlost odbourávání této látky, tzn. že se vyjadřuje se záporným znaménkem. Pokud nahradíme koncentraci antokyanů absorbancí (A), která je dle Lambert-Beerova zákona na koncentraci látky v roztoku lineárně závislá, dostáváme rovnici:

$$\frac{-dA}{dt} = k * A \quad (20)$$

k rychlostní konstanta

Po separaci proměnných můžeme tuto diferenciální rovnici integrovat:

$$\int \frac{dA}{A} = - \int k * t \quad (21)$$

po integraci dostaneme:

$$\ln A = - k * t + C \quad (22)$$

a integrační konstantu vypočteme z hodnoty A v čase t=0

Na počátku reakce platí:

$$C = \ln A_0 \quad (23)$$

čímž se dostáváme ke konečnému řešení:

$$\ln \frac{A_0}{A} = k * t \quad (24)$$

Dalším parametrem, který charakterizuje kinetické procesy, je poločas rozpadu, tj. čas, ve kterém je koncentrace výchozí látky přesně poloviční oproti počáteční hodnotě, zde tedy můžeme určit absorbanci v poločasu rozpadu:

$$A_{1/2} = 0,5 * A_0 \quad (25)$$

Po dosazení (25) do (24) dostaneme vztah pro poločas rozpadu:

$$\frac{\ln 2}{k} = t_{1/2} \quad (26)$$

V našem případě byla první absorbance měřena ve chvíli, kdy už degradace antokyanů probíhala, proto se pokusme o přibližný výpočet počáteční absorbance A_0 z naměřených hodnot a zároveň o výpočet rychlostní konstanty a poločasu rozpadu (degradace) antokyanů.

Použijme vztah (24) a hodnoty absorbancí naměřené např. v čase 5 a 10 minut k sestavení soustavy 2 rovnic o dvou neznámých - jednou neznámou je původní absorbance roztoku (A_0), druhou neznámou je rychlostní konstanta tohoto rozpadu (k):

$$\ln A_0 - \ln A_5 = k * t_5 \quad \text{a zároveň} \quad \ln A_0 - \ln A_{10} = k * t_{10}$$

$$\ln A_0 = \ln 0,2589 + 5k \quad \text{a zároveň} \quad \ln A_0 = \ln 0,2043 + 10k$$

tedy: $\ln 0,2589 + 5k = \ln 0,2043 + 10k$

a tudíž rychlostní konstanta tohoto rozpadu **$k = 0,0473 \text{ min}^{-1}$**

Dopočtěme původní absorbanci dosazením rychlostní konstanty do jedné z rovnic:

$$\ln A_0 = \ln 0,2589 + 5 * 0,0473$$

$$\ln A_0 = -1,114813$$

$$A_0 \sim 0,328$$

Poločas rozpadu (čas, ve kterém degradace antokyanů v roztoku postihla již polovinu z celkového obsahu antokyanů) lze tedy spočítat z (26):

$$t_{1/2} = \ln 2 / 0,0473 = 14,65 \text{ minut}$$

Např. po 30 minutách bychom v měřeném maximu vln.délky $\lambda=592$ nm podle vztahu (24) naměřili absorbanci asi 0,08 atd.

Skutečnou koncentraci antokyanů v daném čase by bylo možné určit při znalosti absorpčního koeficientu příslušné formy anionické chinoidní báze, která se při tomto vysokém pH postupně přeměňuje na žlutý chalkon (s poklesem absorbance v oblasti modrých chinoidních bází kolem 600 nm dochází současně k nárůstu absorbance v oblasti žlutých chalkonů, tj. v oblasti na počátku spektra vln.délek viditelného záření).

Závěr:

Byla proměřena absorpční spektra roztoků antokyanů v černém bezu při pH 10, 12 a 13 (roztoky se sodou a hydroxidem sodným).

Zatímco u černého bezu nedošlo při pH 10 v průběhu 25 minut k žádným změnám, při pH 12 již docházelo v tomto časovém intervalu k postupnému snižování absorbance ve sledované části spektra, (modrozelená barva pomalu slábla, pokles absorbance v absorpčním maximu 592 nm, Obr.37), při pH 13 docházelo k rychlé změně již v průběhu prvních 3 minut, původně tmavozelený roztok se změnil na světlezelený až žlutozelený vlivem postupného rozkladu chinoidní báze a vzniku chalkonů. U červeného zelí docházelo k podobným rychlým změnám již při pH 12, při pH 13 byl během 5 minut roztok již zcela žlutý.

S rostoucí alkalitou prostředí se oxidativní rozklad antokyanů urychluje a i za normální teploty proběhne během několika minut. Jelikož se jedná o chemické reakce 1.řádu, ve kterých uvažujeme pouze 1 složku, která podléhá rozpadu (přeměna chinoidní báze na chalkon spojená s výraznou ztrátou původní barevnosti), bylo by možné z měření změny absorbancí v charakteristickém maximu vln.délky určit rychlostní konstanty rozpadu antokyanů při různých pH v jednotlivých rostlinách.

Zde byla modelově proměřena a spočtena rychlostní konstanta rozpadu antokyanů v černém bezu při pH 12 ($0,0473 \text{ min}^{-1}$).

3. Měření obsahu polyfenolů

K měření obsahu polyfenolů byla zvolena metoda pomocí Folin-Ciocalteuova (FC) činidla (viz kap. 2.6.2), s kyselinou gallovou (KG) jako kalibračním standardem (Obr.4).

Chemikálie: činidlo Folin-Ciocalteu (PENTA Chrudim), bezvodý Na_2CO_3 , kyselina gallová

Pomůcky: pipety, mikropipety 50 a 500 μl , sada zkumavek, spektrofotometr

FC činidlo bylo zředěno destilovanou vodou 10x (5 ml FC + 45 ml vody), 3g sody byly rozpuštěny v 38 ml destil.vody.

Pro přípravu kalibračních roztoků kyseliny gallové bylo naváženo 0,11 g monohydrátu kyseliny gallové (bezvodá kys.gallová by byla použita v množství 0,1 g) a rozpuštěno ve 100 ml destil.vody, potom každý mililitr obsahuje 1 mg KG.

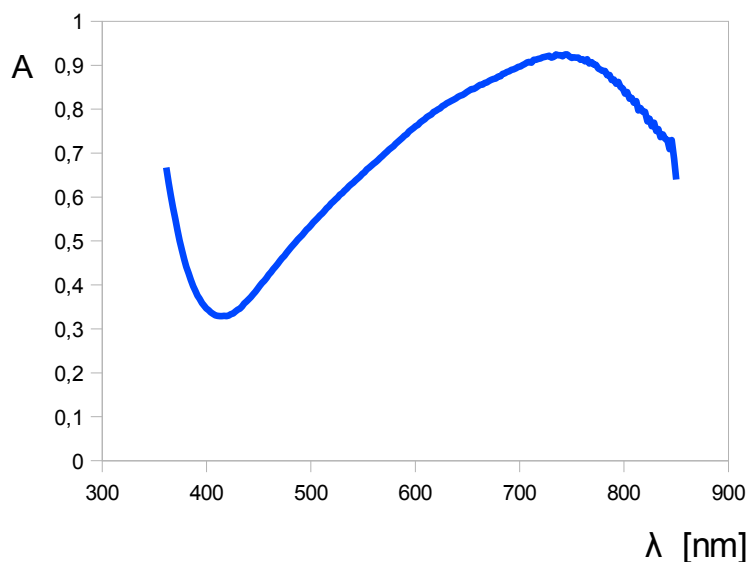
Do 6 odměrných baněk o objemu 10 ml bylo odměřeno postupně 1, 2, 3, 4, 5 a 6 ml tohoto zásobního roztoku KG a všechny doplněny na objemy 10 ml destilovanou vodou, čímž vznikla řada kalibračních roztoků o koncentracích 0,1 až 0,6 mg KG / ml.

Do každé zkumavky bylo dávkováno postupně 1 ml zředěného žlutého FC činidla, 1 ml destil.vody, 50 μl vzorku (tzn. jednotlivé kalibrační roztoky KG nebo 50 μl vlastní testované přefiltrované surové šťávy). Paralelně byl připraven i slepý vzorek, který místo testované šťávy obsahoval 50 μl destil.vody. Po 5 minutách byl do všech zkumavek napipetován 1 ml roztoku sody a po zhruba půl hodině byly u všech vzorků postupně proměřeny absorbance při 765 nm (intenzita modrého zbarvení odpovídala různému obsahu polyfenolů, které vyredukovaly různé množství modrého oxidu molybdeny).

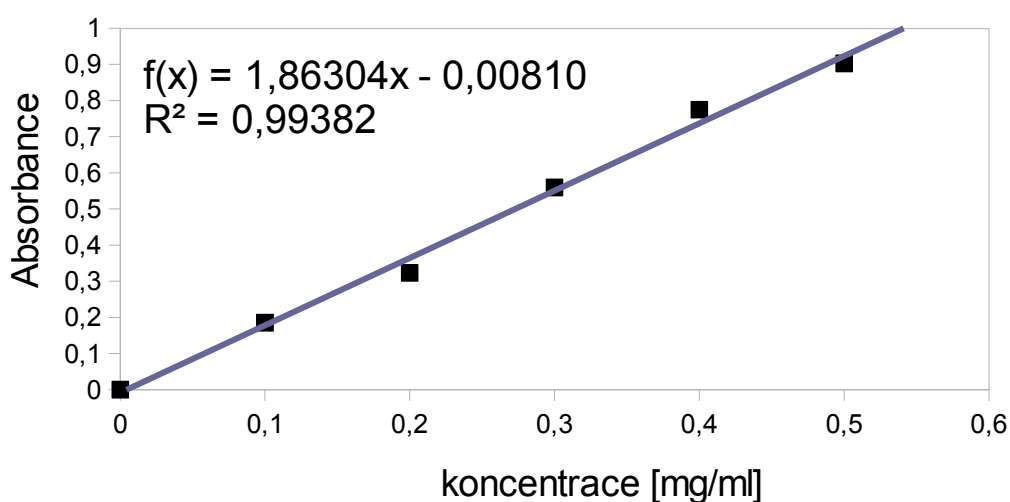
Některé vzorky byly po reakci s FC činidlem příliš tmavé a absorbance příliš vysoká, proto byly před měřením vzorky ještě dále ředěny (2x až 20x).

Pro srovnání obsahu polyfenolů se šťávami obsahujícími antokyany (borůvky, červené zelí a černý bez) byly proměřeny také surové šťávy z dalších zelenin a ovocí (okurka, rajče, brambora, mandarinka, jablko, červená řepa a brokolice), které byly získány stejným postupem na stejném odšťavovači a také přefiltrovány. Každá rostlinná šťáva byla stanovována 5x, z výsledků vypočítán průměr a odchylka. (Tab.5 a 6)

Z rovnice závislosti absorbance a koncentrace (20) z kalibračního grafu kys.gallové (Obr.39) byly (s přihlédnutím k jednotlivým ředěním vzorků) z naměřených hodnot absorbancí při 765 nm (v absorpčním maximu, Obr.38) vypočteny přibližné koncentrace polyfenolů. Ty jsou vyjádřeny obsahem ekvivalentu (kyseliny gallové) na objem vylisované šťávy (mg kys.gallové/ mililitr = gramy kys.gallové/ litr šťávy) . (Tab.7)



Obr.38 Absorpční spektrum vzorku s obsahem fenolů po reakci s FC činidlem



Obr.39 Kalibrační graf kyseliny gallové

OKURKA	RAJČE	BRAM-BORA	MANDA-RINKA	BROKO-LICE	MRKEV	JABLKO
ŘEDĚNÍ: 0	0	0	2x	2x	0	2x
0,301804	0,454285	0,631638	0,436546	0,469475	0,513382	0,536179
0,279785	0,405945	0,595902	0,428718	0,460754	0,520859	0,577378
0,267075	0,431549	0,625809	0,439255	0,506951	0,452652	0,543221
0,297501	0,460403	0,650253	0,416542	0,495895	0,469254	0,557442
0,317596	0,414475	0,634369	0,405579	0,550301	0,471893	0,516617
PRŮM.ABSORB. : 0,292752	0,433331	0,627594	0,425328	0,496675	0,485608	0,546167
VARIABILITA: 6,7%	5,5%	3,2%	3,3%	7,1%	6,1%	4,2%

**Tab.5 Naměřené absorbance vzorků s FC činidlem při různém ředění
(ostatní ovoce a zelenina)**

Do kalibrační rovnice kyseliny gallové

$$A = 1,86304 \cdot c - 0,0081 \quad (20)$$

dosadíme průměrné absorbance každé rostlinné šťávy, vynásobíme příslušným ředěním a vypočteme tak obsah polyfenolů v každé šťávě vyjádřený v ekvivalentu kyseliny gallové v mg / ml, respektive v g / litr.

ČERNÝ BEZ MRAŽENÝ	ČERNÝ BEZ ZAVAŘENÝ	ČERVENÁ ŘEPA	CAPPY ČERNÝ RYBÍZ	RELAX ČERNÝ RYBÍZ	BORŮVKA	ČERVENÉ ZELÍ
ŘEDĚNÍ: 20x	20x	10x	5x	5x	20x	20x
0,089493	0,103546	0,103461	0,281860	0,297806	0,105111	0,109755
0,082977	0,112335	0,086502	0,319656	0,301167	0,115305	0,099838
0,086731	0,103714	0,105390	0,338318	0,263825	0,106708	0,096182
0,092712	0,114533	0,099854	0,314713	0,277634	0,096283	0,095810
0,094131	0,124741	0,089941	0,324722	0,254868	0,107332	0,096162
PRŮM.ABSORB. : 0,089209	0,111774	0,097030	0,315854	0,279060	0,106148	0,099549
VARIABILITA: 5,1%	7,9%	8,6%	6,6%	7,3%	6,4%	6,0%

**Tab.6 Naměřené absorbance vzorků s FC činidlem při různém ředění
(tmavé ovoce a zelenina)**

ROSTLINA	OBSAH POLYFENOLŮ	POROVNÁNÍ HODNOT DLE [18]
	[gram kys.gallové / litr šťávy]	[gram kys.gal./ kg čerstvé váhy]
SALÁTOVÁ OKURKA	0,16	0,3
RAJČE	0,24	0,32
MRKEV	0,27	0,33 (0,26)
BRAMBORA	0,34	0,64 (0,40)
MANDARINKA	0,47	0,21
BROKOLICE	0,54	1,08
ČERVENÁ ŘEPA	0,56	-
JABLKO	0,60	1,55
RELAX ČERNÝ RYBÍZ	0,77	-
CAPPY ČERNÝ RYBÍZ	0,87	-
ČERNÝ BEZ MRAŽENÝ	1,04	-
ČERVENÉ ZELÍ	1,16	0,5 BÍLÉ ZELÍ
BORŮVKA	1,23	-
ČERNÝ BEZ ZAVAŘENÝ	1,29	-

**Tab.7 Přehled naměřených obsahů polyfenolů v rostlin.šťávách
a srovnání s hodnotami jiných autorů**

Diskuze a závěr:

Porovnávat naměřené výsledky polyfenolů s hodnotami z jiných podobných studií je obtížné, protože ostatní autoři zjišťují obsah těchto látek v odlišně získaných extraktech z celých rostlin (např. extrakce okyseleným metanolem aj., viz. kap.2.6.1 teoretic.části), tedy i např. ze slupek, které často obsahují těchto látek nejvíce, a výsledek vyjadřují vztažený na hmotnost čerstvé rostliny, zatímco v této práci byly testovány pouze rostlinné šťávy. Vodítkem a srovnatelnými hodnotami však jsou výsledky měření obsahu polyfenolů standardní Folin-Ciocalteuovou metodou ve vinařství, kde se také proměřují odšťavené a neředěné produkty a hodnoty polyfenolů se pohybují řádově mezi 0,5 až 3 gramy kys.gallové/litr vína. [59]

Tab.7 obsahuje porovnání mnou naměřených hodnot polyfenolů s hodnotami naměřenými u stejných rostlin jinými autory [18], kde jsou ovšem výsledky vztaženy na hmotnost čerstvé váhy rostliny či plodu apod.

Zjištěné hodnoty polyfenolů vyjádřené v gramech kyseliny gallové/ litr testované šťávy potvrdily vysoký obsah těchto látek ve tmavém ovoci a zelenině ve srovnání s jinými rostlinami. U černého bezu, červeného zelí a borůvek se tato hodnota pohybovala kolem 1 g/ litr šťávy, což bylo 2 - 6x více než u šťáv z jiných rostlin, což je možné vysvětlit právě větším podílem antioxidačních látek - antokyanů.

Je však nutné zdůraznit, že za obsahem polyfenolů se skrývají nejrozmanitější flavonoidy a fenolové kyseliny a že tuto hodnotu ovlivňuje také obsah vitamínu C a E, což jsou také významné antioxidanty.

Příjemným zjištěním byl i relativně vysoký obsah polyfenolů ve dražších nápojích z černého rybízu (Cappy a Relax), což svědčí pro menší ředění těchto šťáv vodou.

Nižší obsah polyfenolů v červené řepě oproti např. borůvkám nebo zelí není velkým překvapením, vzhledem k tomu, že v řepě nejsou obsaženy antokyaniny, nýbrž strukturně poněkud odlišná betalainová barviva.

Zajímavý je i téměř o pětinu nižší obsah polyfenolů v čerstvě zmražené šťávě z černého bezu oproti téže šťávě zavařeně. Tento rozdíl byl zprvu považován za chybu měření, proto bylo toto měření prováděno v opakovaných sériích a vždy s podobným výsledkem. Tento rozdíl je možné vysvětlit tím, že při varu dochází k částečné hydrolýze glykosidických vazeb a tím k uvolnění dalších hydroxylových skupin, které mohou dále podléhat oxidaci. Zahuštění šťávy odpařením vody při varu není příliš pravděpodobné, protože var probíhal v uzavřených nádobách.

Tento výsledek zároveň kontrastuje s naměřenými hodnotami obsahu antokyanů v čerstvé (zmražené) a zavařené šťávě z černého bezu, který bude popsán v kap.4 experimentální části (Tab.8), kdy v zavařené šťávě poklesl obsah antokyanů oproti čerstvé o 17,5% po zhruba 20 min. varu.

Tento rozpor (čerstvá šťáva: více antokyanů a méně polyfenolů x zavařená šťáva: méně antokyanů, více polyfenolů) lze vysvětlit jednak tepelnou degradací antokyanů (bude popsáno v kap.5.2 experiment.části) a dále, pokud jde o polyfenoly, je pravděpodobné, že varem dochází k hydrolýze glykosidických aj. vazeb nejen v antokyanech, kdy se uvolní část cukrů a jejich redukujících skupin, které byly dříve obsazeny vazbami s aglykony, ale dochází zároveň k hydrolýze a tím uvolnění různých fenolických struktur, které byly předtím navázány na různé sacharidy, peptidy apod., čímž dojde ke zvýšení redukční (antioxidační) aktivity šťávy, kterou indikuje Folin-Ciocalteuovo činidlo.

4. Měření obsahu antokyanů

Ke kvantitativnímu stanovení antokyanů v rostlinných šťávách byla použita spektrofotometrická metoda dle Giustiové a Wrolstada (viz kapit.4.4).

Při této metodě se proměřují absorbance vzorků obsahujících antokyany zředěné pufrům o pH 1 a pH 4,5. Hodnoty se odečítají v typickém absorpčním maximu kolem 510 nm a dále při 700 nm. Koncentrace antokyanů se vypočítá na základě změřených absorbancí a známého absorpčního (extinkčního) koeficientu standardu a jeho molární hmotnosti, a to dle převažujícího zastoupení antokyanů ve stanovované rostlině.

Vhodným standardem může být „univerzální“ hojně rozšířený 3-monoglukosid kyanidinu (chrysantemin, Obr.11), který má absorpční koeficient $\epsilon = 26\,900 \text{ liter} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ a molární hmotnost $M = 450 \text{ g/mol}$.

V případě, že rostlina obsahuje jako typický aglykon pelargonidin, je možné použít jako standard pelargonidin 3-glukosid, ($\epsilon = 27\,300 \text{ liter} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ a $M = 486,5 \text{ g/mol}$, absorpční maximum A_{\max} při $\lambda = 515 \text{ nm}$), při větším obsahu malvidinu lze použít hodnoty pro malvidin 3-p-kumaryl glykosid ($\epsilon = 30\,200 \text{ liter} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, $M = 718 \text{ g/mol}$, A_{\max} při $\lambda = 545 \text{ nm}$) apod. [60]

Chemikálie: octan sodný, 35% kyselina chlorovodíková, chlorid draselný, destil.voda.

Pomůcky: kádinky, 10 ml odměrné baňky, lžička, pipety, mikropipeta 200 μl , laboratorní váhy, spektrofotometr.

Příprava pufru pH 1:

1,5 g KCl bylo rozpuštěno ve 100 ml destil.vody a 1,7 ml 35% HCl bylo doplněno do 100 ml destil.vodou. Z prvního roztoku bylo odpipetováno 25 ml a smícháno se 67 ml druhého roztoku. Vzniklo přes 90 ml pufru pH 1.

Příprava pufru pH 4,5:

5 g octanu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml destil.vody, 8,5 ml 35% HCl bylo doplněno destil.vodou do 100 ml. Celý objem 1.roztoku se smíchal se 60 ml druhého roztoku a přidalo se ještě 90 ml destil.vody. Vzniklo 250 ml pufru pH 4,5.

Přefiltrované rostlinné šťávy z borůvek, červeného zelí, černého bezu a extrakt ze slupek tmavých vinných hroznů (18 g čerstvých slupek z tmavých hroznů, což v sesychacím poměru 3:1 odpovídá 6 g sušených slupek), bylo 30 minut. extrahováno

varem ve 100 ml destil.vody) byly naředěny připravenými pufrý, změřeny absorbance při 520 a 700 nm (naředěno pro spektrofotometrii) a dosazením do vztahů (22) a (23) vypočtena koncentrace antokyanů.

$$A = (A_{\text{VIS-max}} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\text{VIS-max}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \quad (22)$$

$$c_{\text{ACY}} = (A * M * \text{DF} * 1000) / (\epsilon * l) \quad (23)$$

- A absorbance [-] při pH 1 a 4,5 při $\lambda = \pm 520 \text{ nm}$ a 700 nm
l délka optické dráhy (šířka kyvety) (1 cm)
 ϵ absorpční koeficient kyanidin 3-glukosidu (26 900 $\text{litr} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
M molární hmotnost antokyanu (450 g/mol)
DF celkové ředění (při extrakci*při fotometrování...)
 c_{ACY} výsledná koncentrace monomerního antokyanu [mg/litr]

Výsledky měření:

ROSTLINA	pH 1 A ₅₂₀	pH 1 A ₇₀₀	pH 4,5 A ₅₂₀	pH 4,5 A ₇₀₀	A celkem	ŘEDĚNÍ (DF)	c_{ACY} [g/litr]
ČERNÝ BEZ zavařený	0,199860	0,018875	0,078323	0,023346	0,126007	100	0,211
ČERNÝ BEZ mražený	0,221710	0,025284	0,077576	0,029434	0,148285	100	0,248
ČERVENÉ ZELÍ	0,073547	0,000000	0,069946	0,029373	0,032974	1000	0,552
BORŮVKY	0,155517	0,000000	0,082794	0,055191	0,127914	1000	2,140
HROZNY	0,247604	0,051422	0,081985	0,031281	0,145478	3000	7,301*

* ... obsah monomerního antokyanu v mg/ kg čerstvé váhy slupek

Tab.8 Naměřený obsah kyanidin 3-glukosidu ve tmavém ovoci

ROSTLINA	OBSAH ANTOKYANŮ [gram / litr šťávy]	POROVNÁNÍ HODNOT DLE [60] [gram / kg čerstvé váhy]
ČERNÝ BEZ	0,211 - 0,248	3,61 - 12,66
ČERVENÉ ZELÍ	0,552	0,25
BORŮVKY	2,14	1,09 - 2,61
HROZNY (slupky)	7,301*	0,03 - 7,50

* ... obsah monomerního antokyanu v mg/ kg čerstvé váhy slupek

Tab.9 Porovnání naměřených hodnot antokyanů s hodnotami v [60]

Závěr:

Obsah antokyanů ve tmavém ovoci měřený spektrofotometrickou metodou dle Giustiové a Wrolstada se pohyboval v hodnotách 0,21 až 2,15 g monomerního pigmentu kyanidin 3-glukosidu / litr surové šťávy, respektive u hroznových slupek kolem 7,3 g/ kg čerstvé váhy slupek. U vinných slupek byl obsah antokyanů vypočítán z navážky suchých slupek extrahovaných vroucí vodou a ze sesychacího poměru 3:1 (18 g čerstvých slupek = 6 g sušených slupek, což při extrakci tohoto množství 100 ml vody odpovídá obsahu přibližně 1,31 g antokyanů / 1 litr vody).

Tyto hodnoty jsou v souladu s hodnotami naměřenými jinými autory, kteří měřili obsah antokyanů ve vinné révě touto metodou. [60] [61]

Je zřejmé, že pro zpřesnění výsledků by bylo potřeba provést větší počet měření a že další nepřesnost do výsledku vnáší přepočtení na univerzální monosidický pigment, ačkoliv testované rostliny obsahují celou škálu antokyanů (viz kapit. 4.2 teor.části)

Např. v borůvkách je obsažen kromě chrysanteminu (kyanidin 3-glukosid), který byl použit jako standard, také derivát malvidinu a při přepočtu na standard malvidin 3-p-kumaryl glykosid by hodnota obsahu antokyanů v borůvkách vycházela ještě vyšší (3,04 g antokyanu/ litr šťávy).

Z předchozího vyplývá, že se (podobně jako u stanovování polyfenolů) jedná o metody pouze orientační. Jelikož je proměřován značně variabilní přírodní materiál, nacházíme i u rostlin stejného druhu dost široká rozpětí hodnot naměřených různými autory. Nicméně je jasné, že se při určování **obsahu antokyanů** v typickém tmavém ovoci a zelenině pohybujeme **v hodnotách od stovek miligramů do několika málo gramů až už na kilogram čerstvé váhy rostliny nebo na litr rostlinné šťávy** (tyto dvě hodnoty se sobě pochopitelně přibližují hlavně u plodů s velkým obsahem vody a menším obsahem sušiny - viz např. borůvky).

5. Měření degradace antokyanů

5.1 Měření degradačních indexů antokyanů

Pomocí degradačních indexů (DI) antokyanů [12] se stanovuje stupeň odbourání antokyanů. Lze tak posoudit stupeň rozložení antokyanů během zpracování a skladování různých rostlinných produktů, např. extraktů, džusů, kompotů apod.

V potravinářství je tento index používán ke sledování a hodnocení kvality těchto výrobků. Čerstvé šťávy, které obsahují antokyany, mají degradační index okolo 1,0 , při hodnotách 6 -7 jsou už šťávy výrazně hnědé.

Podstatou metody je proměřování absorbance roztoků při pH 1 a pH 4,5 v absorpčním maximu 510 až 530 nm a degradační index se počítá podle vzorce:

$$DI = \frac{A_{1,0}}{A_{1,0} - A_{4,5}} \quad (24)$$

$A_{1,0}$ absorbance při pH 1

$A_{4,5}$ absorbance při pH 4,5

Chemikálie: octan sodný, KCl, HCl.

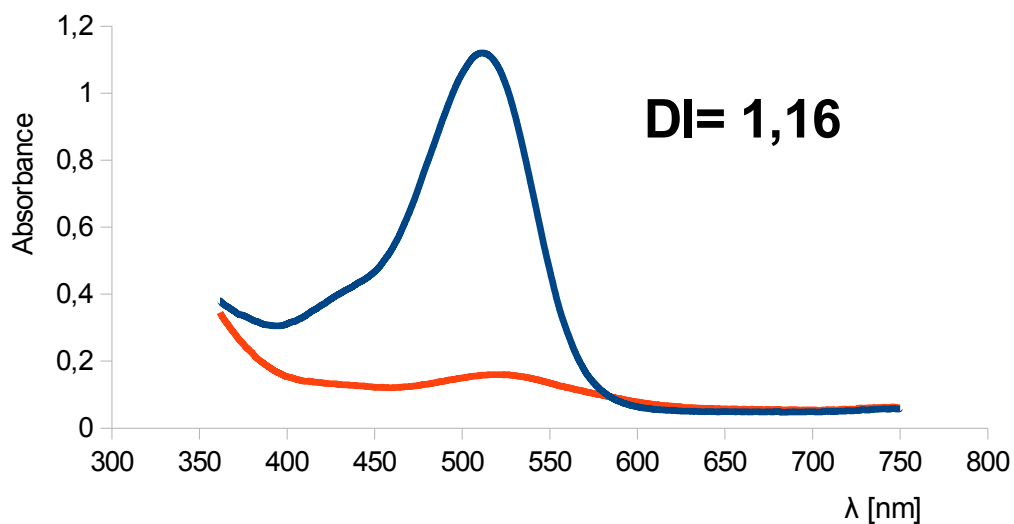
Pomůcky: pipety, odměrné baňky 10, 100 a 250 ml, laboratorní váhy, spektrofotometr.

Pufry pH 1 a pH 4,5 byly připraveny způsobem popsaným v kapitole 4 experiment.části (Měření obsahu antokyanů). Do 10 ml odměrných baněk bylo pipetováno po 2 ml zfiltrované ovocné šťávy a objem doplněn na 10 ml pufrem (od každé šťávy byly tedy připraveny vždy 2 roztoky, jeden pH 1, druhý pH 4,5) a tyto roztoky byly ponechány hodinu ve tmě, aby se převedly jednotlivé formy antokyanů na flavyliové, respektive na karbinolové soli. Následně byla proměřena absorpční spektra těchto roztoků.

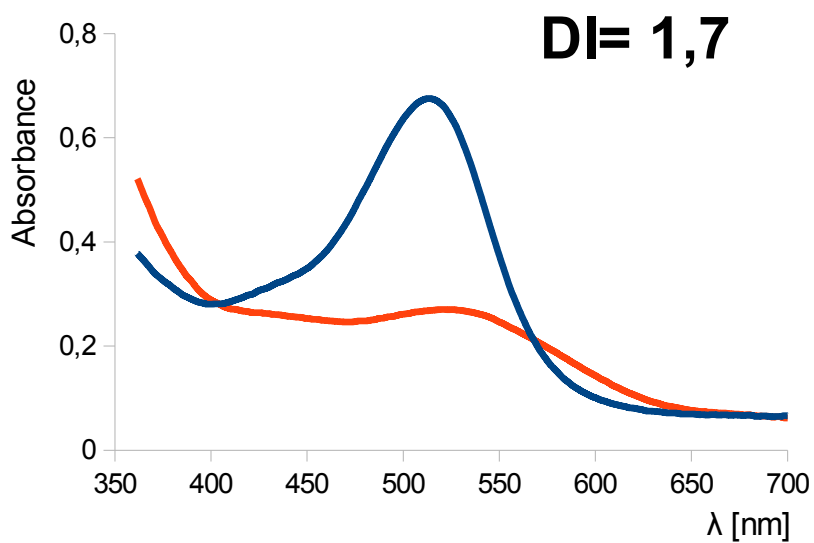
Proměřovány byly jak poměrně čerstvé rostlinné šťávy, tak i starší šťávy (kompoty).

Výsledky měření:

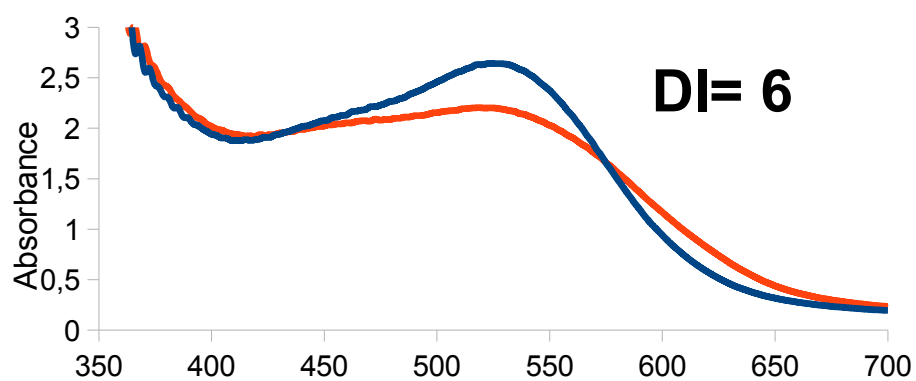
Pozn.: — pH 1 (KCl + HCl)
— pH 4,5 (CH₃COONa + HCl)



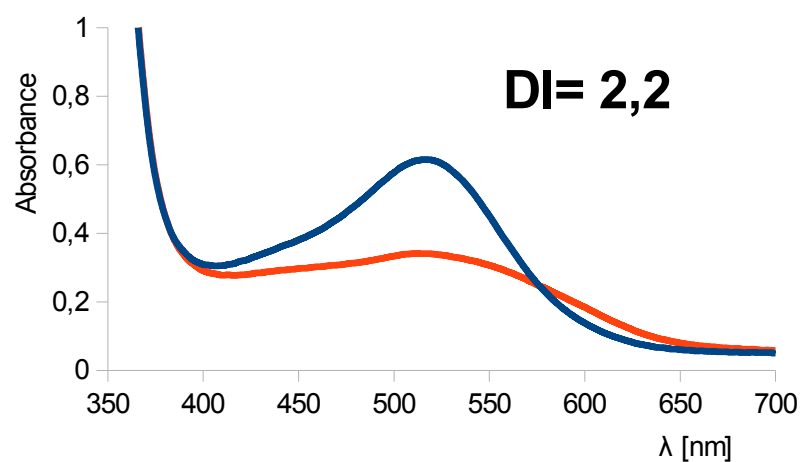
Obr.40 Čerstvá (mražená) šťáva z černého bezu



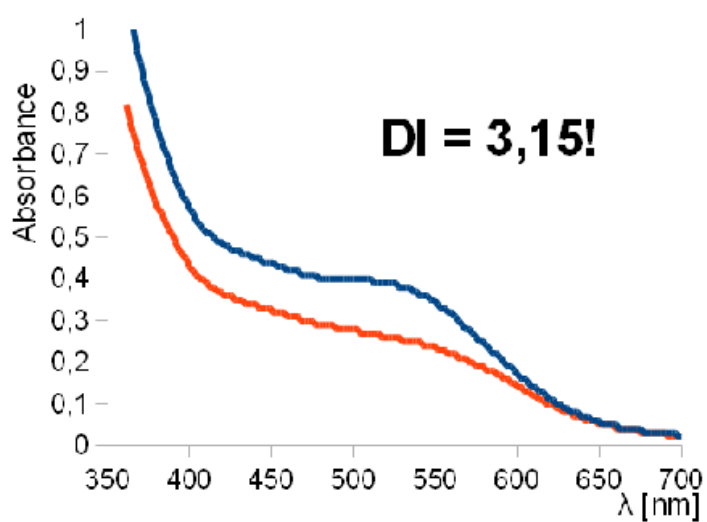
Obr.41 Zavařená šťáva z černého bezu



Obr.42 3 roky starý borůvkový kompot, zkvašený a nahnědlý



Obr.43 1 rok starý višňový kompot



Obr.44 35 let starý višňový kompot

5.2 Měření tepelné degradace antokyanů

Ze slupek tmavých vinných hroznů byl připraven extrakt stejným způsobem, jako je popsáno v kap.4 exper.části, tedy 18 g čerstvých slupek (odpovídá 6 g sušených) bylo extrahováno varem ve 100 ml destil.vody. Pro potřeby měření tepelné degradace však byla extrakce varem prováděna tentokrát jen po dobu 15 minut, poté byl extrakt zcezen a přefiltrován.

Borůvková šťáva získaná z několik dní rozmražených borůvek, čerstvá šťáva z červeného zelí a čerstvě rozmražená šťáva z čerstvého (nezavařeného) černého bezu byly přefiltrovány a poté byly v hermeticky uzavřených nádobách vystaveny varu ve vodní lázni po dobu 4 hodin. Byly odebrány vzorky před začátkem varu, a dále po 1, 2 a 4 hodinách varu. U těchto vzorků byly také změřeny degradační indexy a stanoven obsah antokyanů metodou dle Giustiové a Wrolstada (metoda popsána v předchozí kapitole). (Tab.10 - 17)

Borůvky:

DOBA VARU [hod.]	ABSORBANCE pH 1	ABSORBANCE pH 4,5	DEGRADAČNÍ INDEX
0	1,179398	0,123642	1,12
1	0,734863	0,138794	1,23
2	0,482285	0,144487	1,43
4	0,292847	0,149460	2,04

Tab.10 Tepelná degradace antokyanů - borůvky (60x ředěno, 520 nm)

DOBA VARU [hod.]	pH 1 A ₅₂₀	pH 1 A ₇₀₀	pH 4,5 A ₅₂₀	pH 4,5 A ₇₀₀	A celkem	ŘEDĚNÍ (DF)	c _{ACY} [g/litr]
0	1,179398	0,038727	0,123642	0,016647	1,033676	60x	1,037
1	0,734863	0,037750	0,138794	0,041977	0,600296	60x	0,603
2	0,482285	0,035461	0,144487	0,055817	0,358154	60x	0,359
4	0,292847	0,024399	0,149460	0,061417	0,180405	60x	0,181

c_{ACY} koncentrace monomerního antokyanu (kyanidin-3-glukosidu)

Tab.11 Pokles obsahu antokyanů po 1 - 4 hod. varu (borůvky)

Červené zelí:

DOBA VARU [hod.]	ABSORBANCE pH 1	ABSORBANCE pH 4,5	DEGRADAČNÍ INDEX
0	0,906387	0,566101	2,66 ?
1	0,631058	0,362718	2,35 ?
2	0,622925	0,215942	1,53
4	0,313904	0,130570	1,71

Tab.12 Tepelná degradace antokyanů - červené zelí (60x ředěno, 524 nm)

DOBA VARU [hod.]	pH 1 A ₅₂₄	pH 1 A ₇₀₀	pH 4,5 A ₅₂₄	pH 4,5 A ₇₀₀	A celkem	ŘEDĚNÍ (DF)	c _{ACY} [g/litr]
0	0,906387	0,110077	0,566101	0,199432	0,429641	60	0,431
1	0,631058	0,090973	0,362718	0,208115	0,385482	60	0,387
2	0,422925	0,056360	0,215942	0,115828	0,266451	60	0,267
4	0,313904	0,043808	0,130570	0,049423	0,188949	60	0,190

Tab.13 Pokles obsahu antokyanů po 1 - 4 hod. varu (červené zelí)

Černý bez:

DOBA VARU [hod.]	ABSORBANCE pH 1	ABSORBANCE pH 4,5	DEGRADAČNÍ INDEX
0	0,374741	0,081299	1,28
1	0,434753	0,269760	2,63
2	0,364105	0,308929	6,59
4	0,256165	0,218185	6,74

Tab.14 Tepelná degradace antokyanů - mraž. černý bez (60x ředěno, 510 nm)

DOBA VARU [hod.]	pH 1 A ₅₁₀	pH 1 A ₇₀₀	pH 4,5 A ₅₁₀	pH 4,5 A ₇₀₀	A celkem	ŘEDĚNÍ (DF)	c _{ACY} [g/litr]
0	0,374741	0,000000	0,081299	0,001862	0,295304	60	0,296
1	0,434753	0,054245	0,269760	0,147736	0,258484	60	0,259
2	0,364105	0,098587	0,308929	0,184982	0,141571	60	0,142
4	0,256165	0,096008	0,218185	0,119659	0,061631	60	0,062

Tab.15 Pokles obsahu antokyanů po 1 - 4 hod. varu (mražený černý bez)

Vinná réva (slupky):

DOBA VARU [hod.]	ABSORBANCE pH 1	ABSORBANCE pH 4,5	DEGRADAČNÍ INDEX
0	0,425797	0,047058	1,12
1	0,391144	0,068848	1,21
2	0,326096	0,086044	1,36
4	0,264114	0,156006	2,44

Tab.16 Tepelná degradace antokyanů - vinné slupky (1000x ředěno, 522 nm)

DOBA VARU [hod.]	pH 1 A522	pH 1 A700	pH 4,5 A522	pH 4,5 A700	A celkem	ŘEDĚNÍ (DF)	c_{ACY} [g/kg čerstvých slupek]
0	0,425797	0,000000	0,047058	0,000000	0,378739	1000	6,336
1	0,391144	0,000000	0,068848	0,000000	0,322296	1000	5,392
2	0,326096	0,000000	0,086044	0,000000	0,240052	1000	4,016
4	0,264114	0,041428	0,156006	0,070465	0,137145	1000	2,294

Tab.17 Pokles obsahu antokyanů po 1 - 4 hod. varu (vinné slupky)

Závěr:

Z grafů (Obr.40,41) a tabulek (Tab.10-17) je patrné, že při vyšší teplotě skutečně dochází k degradaci antokyanů, a to i v jejich přirozeně kyselém prostředí (pH 3-5): čerstvá, respektive zmražená čerstvá šťáva z plodů černého bezu vykazuje DI téměř 1, půlhodinový var téže šťávy zhoršil její DI na 1,7.

Špatně uzavřený, nahnědlý a mírně zkvašený, 3 roky starý borůvkový kompot podle očekávání vykazoval již značnou degradaci antokyanů (DI 6) , tedy dle potravinářských kritérií velmi špatnou kvalitu. (Obr.42)

Tepelná degradace antokyanů však neprobíhala u všech rostlin stejně rychle. V původně čerstvé (zmražené) borůvkové šťávě klesal obsah antokyanů zhruba na polovinu s každou hodinou varu, z počáteční hodnoty asi 1 g antokyanů/litr šťávy až na necelých 200 mg po 4 hodinách varu. I počáteční hodnota obsahu antokyanů je ale téměř poloviční oproti výsledkům naměřeným u téhož vzorku stejnou metodou při stanovení obsahu antokyanů ve tmavém ovoci (viz Tab.8 v minulé kapitole). Přestože byla použita v obou případech stejná metoda, stejné chemikálie, měřicí přístroj, postup i vzorek šťávy, klesl obsah antokyanů na polovinu!

Ke stanovení antokyanů byl totiž sice použit týž rostlinný materiál, původně čerstvé a zmražené plody, ale od jejich rozmražení a vylisování při první analýze uplynul více než týden, kdy byla šťáva ponechána rozmražená v otevřené nádobě v chladničce. To je možné vysvětlení tak velkého rozdílu obsahu antokyanů naměřeného na téměř rostlinném materiálu.

U ostatních rostlin byly naměřené hodnoty antokyanů v dobré shodě s obsahy antokyanů naměřenými dříve (viz Tab.8).

U červeného zelí docházelo k plynulejšímu úbytku obsahu antokyanů s dobou varu, po 4 hodinách klesl jejich obsah na méně než polovinu původního množství. Nereprodukovatelná změna degradačních indexů u červeného zelí může souviset s dalšími změnami barevnosti zelné šťávy, kdy na počátku varu byla šťáva takřka modrá- modrofialová, po 4 hodinách varu (bez přísad) byla již červená.

Černý bez odolával varu 1 hodinu ještě bez výrazných změn obsahu antokyanů, pak ale jejich obsah prudce poklesl, po 4 hodinách varu až na pětinu.

U vinných slupek klesal obsah antokyanů plynule, a to zhruba o 1 g/ kg čerstvé váhy s každou hodinou varu, takže po 4 hodinách klesl obsah antokyanů zhruba na třetinu původního množství.

Antokyan v červeném zelí a ve vinné révě byly tedy vůči tepelné degradaci nejodolnější, antokyan v borůvkách a černém bezu degradovaly mnohem rychleji, značný úbytek antokyanů byl zaznamenán i u borůvkové šťávy, která byla ponechána delší dobu rozmražená.

Na degradaci antokyanů se kromě vysoké teploty podílí i světlo, což dokazují DI dvou proměřených višňových kompotů- rok starý produkt vykazoval DI 2,2 a naproti tomu už vskutku „archívní“ - více než 35 let starý- višňový kompot ze sklepa mé matky si díky skladování v dokonalé tmě a stabilní nízké teplotě uchoval ještě neuvěřitelný DI 3,15 a i senzoricky se jevil být stále v přijatelné jakosti. (Obr.43,44).

Všechna provedená měření tedy prokázala vedle nestability v zásaditém prostředí na jedné straně značnou citlivost na vyšší teploty, na druhé straně je možné kyselé roztoky antokyanů uchovávat ve tmě a chladu s omezením přístupu vzduchu po velmi dlouhou dobu v přijatelném stavu (zavařeniny, víno).

6. Barvení textilií antokyany

K barvení textilií byla použita šťáva z červeného zelí, černého bezu, borůvek a extrakt ze slupek tmavých hroznů. Barvenými textiliemi byla vlna, bavlna a polyamid.

Barvení probíhalo láznovým způsobem při délce lázně 1:30 až 1:50 (1-2 g textilie/ 50 ml lázně) po dobu 30 minut při postupném zvyšování teploty barvení do varu.

6.1 Barvení červeným zelím v různě kyselých lázních

Pomůcky: pipety, patronový barvicí aparát pro termostatované láznové barvení, bavlněná a vlněná tkanina, mikropipeta 500 μ l, spektrofotometr.

Chemikálie: destil.voda, sada bezbarvých pufrů v hodnotách pH 1 - 10, soda, ocet.

Do každé barvicí lázně bylo dávkováno 5 ml šťávy z červeného zelí a objem doplněn na 50 ml pufrům v hodnotách pH 1 - 10. Pokud je v zelné šťávě obsaženo přibližně 500 mg antokyanů/ liter šťávy (dle výsledků analýzy obsahu antokyanů v kap.4 experimentální části), pak každá lázeň obsahovala přibližně 2,5 mg barviva (antokyanu) na 1,5 g barvené textilie, proto bylo výsledné vybarvení velmi slabé- dle očekávání odpovídalo méně než 0,15 % vybarvení , vlna se dle očekávání obarvila více než bavlna. (Obr.45,46)

Jelikož zelí velmi citlivě barevně reaguje na změny pH, posouvá se s rostoucí alkalitou bathochromně vlnová délka maximální absorpce i vlnová délka minimální remise takto nabarvených tkanin.

Z tabulky 18 je patrný tento neustálý posun s rostoucím pH, ovšem samotná textilní vlákna se také chovají jako určité pufrací systémy, proto tento posun vlnových délek není u remisí shodný s posunem absorpčních lázní, a také remisní minima vlny a bavlny, které byly barveny stejnou lázní, se mírně liší. (Obr.45-47)

Dle předpokladu se absorpční maxima barvicích lázní nelišila před a po barvení, u remisních hodnot tkanin však musím upozornit na hrubší krokování remisních vlnových délek (po 10 nm) oproti absorpčnímu spektrofotometru (po 2 nm).

Předpokládaným problémem byla nestabilita jednotlivých barevných odstínů tkanin získaných při odstupňovaných pH jednotlivých barvicích lázní, kdy se původní odstín posouval již při praní destilovanou vodou. Toto je patrné obzvláště u zelí, které velmi

citlivě barevně reaguje i na malé změny pH. Z tohoto důvodu se tedy červené zeli pro barvení textilií na různé odstíny nehodí.

pH	Absorbance λ_{\max} [nm]	Remise -vlna λ_{\max} [nm]	Remise -bavlna λ_{\max} [nm]
1	518	530	-
3	528	540	530
4	532	550	540
4,5	534	550	-
5	538	550	540
6	546	550	550
7	552	570	550
8	568	570	550
9	568	580	560

Tab.18 Srovnání absorpčních maxim barvicích lázní a remisních minim nabarvených tkanin s měnícím se pH barvicí lázně (červené zeli)

Slušnou odolnost (nejen odstínovou) ve vodě a při šetrném praní alkalickou lázní však vykazuje tkanina nabarvená šťávou z červeného zeli s malým přídavkem sody, kdy se tkanina obarví zeleně a v místech kontaktu se slabší kyselinou (octová, vinná, tj. při pH kolem 3) se rychle zbarví růžově až fialově. Tento efekt je obzvláště výrazný na vlněné tkanině. Tohoto barevného efektu zásadité/kyselé prostředí = zelená/růžová barva - by bylo možné využít např. pro domácí opakované vzorování zeleně nabarvené vlněné tkaniny, protože při následném vyprání v alkalické lázni (prací prostředek na barevnou vlnu, např. Perwoll Color Magic s přídavkem malého množství sody) se růžový vzor opět vrátí k zelené barvě a tkaninu je možné např. pomocí octa navzorovat znovu a jinak. (Obr. 48)

Vlna obarvená zeleně extraktem z červeného zeli s přídavkem sody byla několikrát opakovaně okyselena na tmavě růžový odstín a opět vložena do horké alkalické lázně (s přídavkem sody) pro rychlý návrat k zelené barvě a po každém z těchto těchto 7 alkalicko/acidických horkých cyklů proměřena na remisním spektrofotometru (Datacolor). (Obr. 49, 50, 51)

Pozn.: K dosažení hodnoty pH 3 pomocí octa je možné použít tento jednoduchý výpočet a úvahu:

Kyselina octová je slabá organická kyselina, pro výpočet jejího pH platí přibližný vztah :

$$\text{pH} = 1/2 (\text{pK}_{\text{CH}_3\text{COOH}} - \log c_{\text{CH}_3\text{COOH}}) \quad (25)$$

Dle tabulek je hodnota pK kyseliny octové 4,76. Pokud se chceme dostat na hodnotu pH 3, dosadíme do (25):

$$\begin{aligned} 3 &= 1/2 (4,76 - \log c) \\ 6 &= 4,76 - \log c \\ - 1,24 &= \log c \\ c &= 0,057 \text{ mol/litr kys.octové (100\%)} \end{aligned}$$

Molární hmotnost kys.octové $M = 60 \text{ g/mol}$,

pak tedy 0,057 mol odpovídá 3,42 g 100 % kys.octové, což nepřímou úměrou odpovídá zhruba 42,5 g/litr kyseliny octové 8% (koncentrace potravinářského octa).

Pokud pomineme vliv hustoty kyseliny octové, tak k získání tekutiny o přibližném pH 3 v domácích podmínkách stačí odměřit něco přes 40 ml octa a doplnit do 1 litru vodou.

Takto je možné za pomoci červeného zelí, jedlé sody, octa a vlněné tkaniny vzorovat zelenou tkaninu dočasnými růžovými vzory.

Analogicky- pokud použijeme kyselinu citronovou, což je také slabá organická kyselina, avšak silnější než kys.octová ($\text{pK}_1 = 3,15$),

molární hmotnost $M = 192 \text{ g/mol}$,

pak stačí navážit do 1 litru vody 0,27 gramu krystalické kyseliny citronové k dosažení pH 3.



Obr.45 Barvení červeným zelím (0,15%) při různém pH - bavlna



Obr.46 Barvení červeným zelím (0,15%) při různém pH - vlna



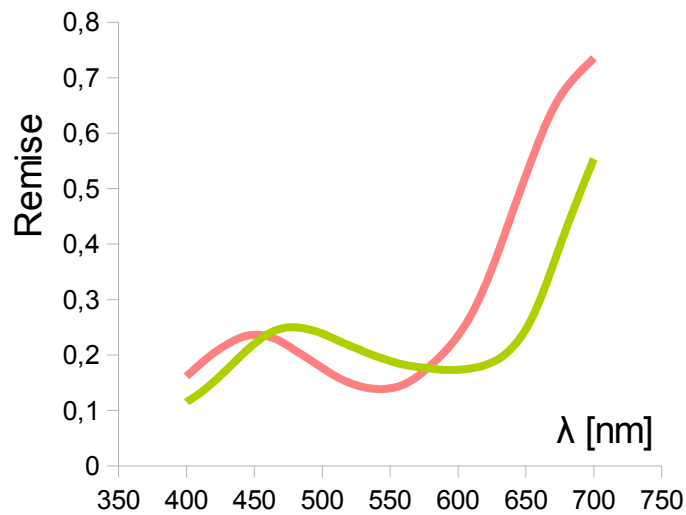
Obr.47 Zbytkové lázně po barvení vlny červeným zelím při různém pH



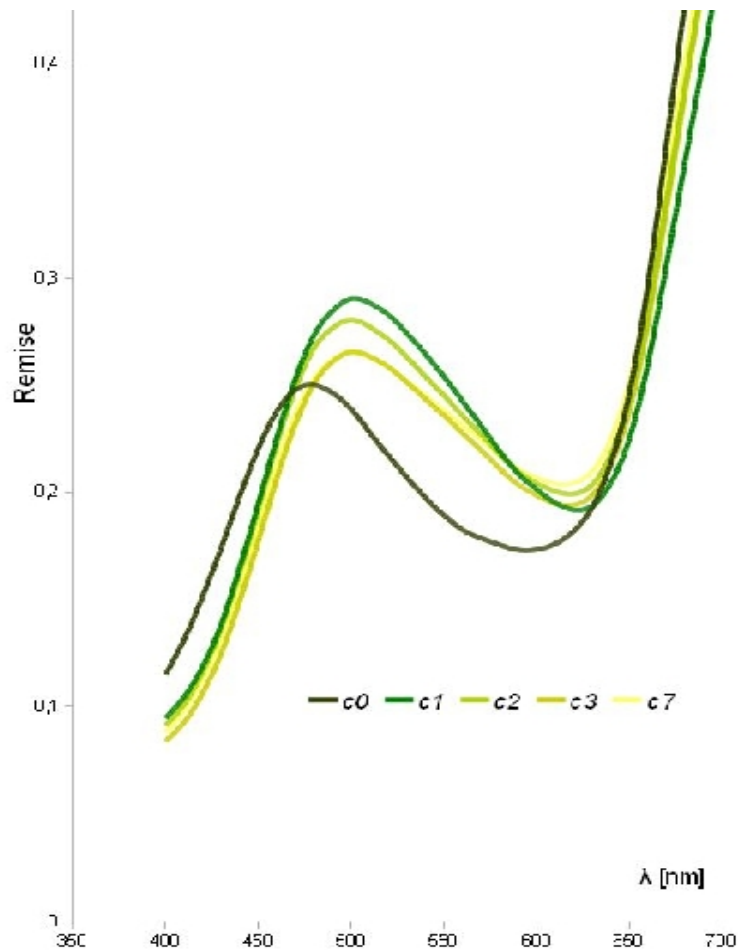
Obr.48 Vzorování vlny citrónem a octem



Obr.49 Vlněná tkanina obarvená v zásaditém/kyselém pH červeným zelím
zleva: původní vybarvení a vybarvení po 1, 2, 3 a 7
okyselovacích cyklech s návratem do původního stavu
při nešetném praní v horké vodě



Obr.50 Remisní křivky kyselého (růžová) a zásaditého (zelená) vybarvení vlněné tkaniny antokyany z červeného zelí



Obr.51 Změny remise vln.tkaniny po 7 cyklech kyselá/zásaditá (černá křivka= původní kalný odstín zelené)

Z grafu (Obr.51) je patrný odstínový posun po 1.okyselení a následné alkalické lázni, kdy tkanina získala jasnější a brilantnější odstín zelené oproti původnímu kalnému šedozelenému odstínu. Tento projasněný odstín se již po dalších cyklech neměnil.

Jasně zelené vybarvení se vracelo po krátkém praní či namáčení v horké alkalické lázni (při 30 °C trvá návrat k původní barvě o trochu déle). Při nešetrném praní v horké vodě vykazovala zeleně obarvená tkanina horší stálost (viz Obr.49, 51) než při praní při 30 °C, přesto vydržela 7 těchto cyklů.

V Tab.19 jsou zaznamenány odstínové změny zelené vlněné tkaniny při praní v horké alkalické lázni po dobu 15 minut, v průběhu 7 cyklů okyselení/alkalizování. Odstínová odchylka je uvedena v odchylkách CIELAB (ΔE) vypočtených z L, a, b hodnot zelené vlněné tkaniny dle vztahu (17), které byly naměřeny na remisním spektrofotometru (Datacolor) a vyjádřena je i v odstínových odchylkách šedé stupnice (viz Tab.3). (Odchyly po jednotlivých cyklech jsou vyjádřeny vždy vůči stavu v předchozím měřeném cyklu).

acidobazický cyklus	odchylka CIE-Lab (ΔE)	stupeň šedé stupnice
1.	15,2	1
2.	2,86	3-4
3.	2,10	4
5.	1,28	4
7.	2,9	3-4

Tab.19 Odstínové odchylky po opakov. okyselení a praní v horké zásadité lázni

Závěr:

Antokyany v červeném zelí je možné využít k barvení vlněné tkaniny v zásaditém prostředí (pH 9) s přídavkem sody, kdy se tkanina nabarví zeleně. Tuto tkaninu lze za pomoci různých technik růžově vzorovat slabší organickou kyselinou (např.octem nebo citronovou šťávou či roztokem kys.citronové) a vše lze uvést do původního stavu šetrným vypráním v pracím prostředku na barevnou vlnu při 30 °C, s přídavkem sody do prací lázně. Tento postup je možné opakovat v několika cyklech s přijatelnou stálostí v praní, po větším množství cyklů lze případně tkaninu opět zelenou šťávou přibarvit a celý efekt tak snadno oživit.

6.2 Porovnání textilií barvených různými antokyany

Byly připraveny následující barvicí lázně:

100 g nakrájeného červeného zelí + 100 ml destilované vody

100 ml neředěné šťávy z plodů černého bezu

5 g sušených slupek z tmavých hroznů vinné révy + 100 ml destil. vody

100 ml neředěné šťávy z plodů brusnice borůvky

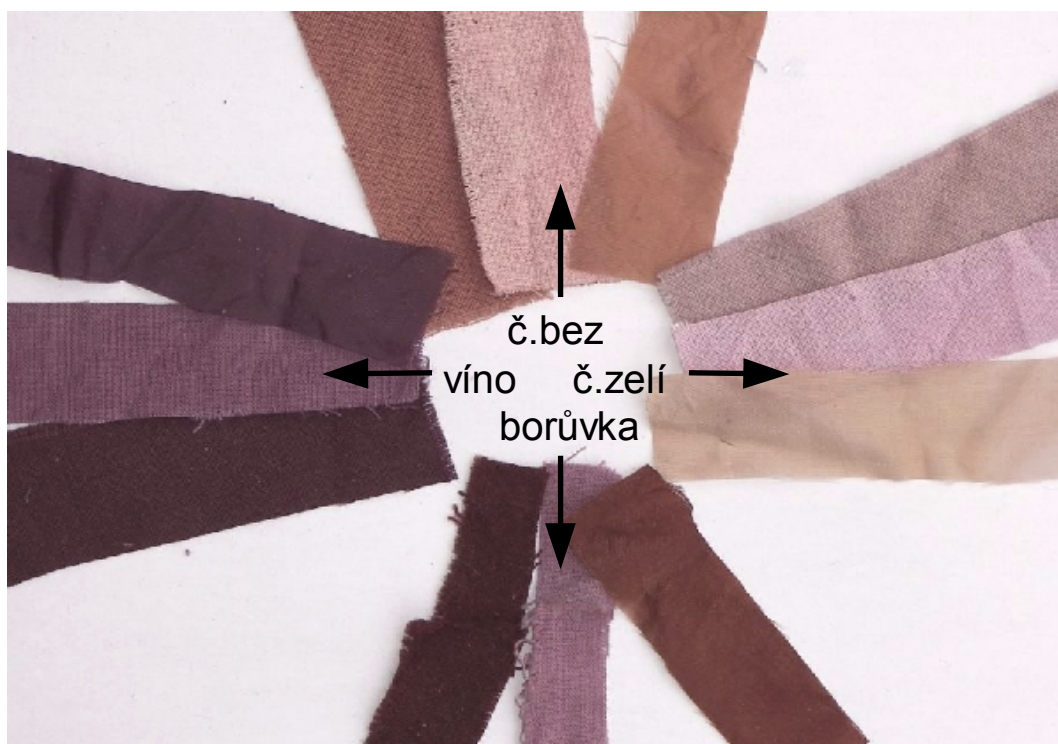
Červené zelí a vinné slupky byly nejprve po dobu asi 15 minut povařeny ve vodní lázni pro extrakci antokyanů. (Dle studie [61] postačuje k této extrakci poměrně krátká doba, autoři zjistili, že při varu vinných slupek ve vodě se největší podíl antokyanů převedl do roztoku během prvních 30 minut a že delší doba extrakce již nebyla příliš efektivní.) Do každé z těchto lázní byl vložen 1 g vlněné tkaniny, 1 gram bavlněné tkaniny a 1 g polyamidové tkaniny.

Tkaniny byly barveny lázniovým způsobem po dobu 30 minut při 95 °C a v chladnoucích barvicích lázních ponechány po několik hodin. Následně byly všechny tkaniny důkladně vyprány v horké vodě kvůli stržení povrchově ulpělého barviva z textilií, vysušeny a jejich vybarvení porovnána. (Obr.52)

Závěr:

Podle očekávání se bavlněná tkanina barví hůře než vlněná. Z černého bezu a červeného zelí se získalo na vlně středně syté vybarvení, na bavlně jen slabý odstín fialové. Vlněná tkanina barvená slupkami z hroznů vinné révy a také šťávou z borůvek získala velmi syté vybarvení odstínu tmavě vínové s nahnědlým nádechem. Překvapivě sytým odstínem se nabarvil i polyamid, a to všemi plodinami, kromě červeného zelí, které polyamid vlastně jen zašpinilo do šeda. Polyakrylová tkanina neznámého původu (anionická modifikace??) se neobarvila vůbec.

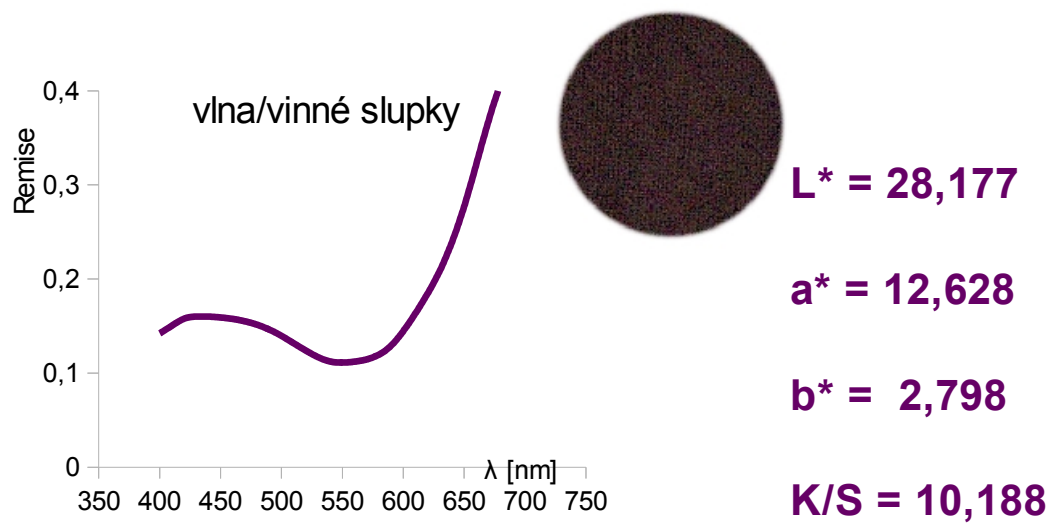
Barvení textilií vybranými rostlinami s obsahem antokyanů ukazují různorodost jak v odstínu, tak i v sytosti získaného vybarvení. Nejintenzivněji z testovaných rostlin se barvily textilie borůvkami a extraktem ze slupek tmavých vinných hroznů, kdy na bavlně vzniká fialové zabarvení středně sytého odstínu, na polyamidu a především na vlně pak velmi sytý hnědo-bordó odstín (Obr.53).



Obr.52 Tkaniny obarvené různými antokyany (vždy uprostřed trojice bavlna, vlevo od ní vlna, vpravo polyamid, borůvka naopak)

	L*	a*	b*	K/S	λ [nm] (R_{min.})
č. bez/bavlna	67,803	7,277	5,215	0,612	540
č. bez/vlna	41,191	12,332	8,140	4,001	530
víno/bavlna	43,403	11,422	-5,299	3,557	550
víno/vlna	28,177	12,628	2,798	10,188	540
č.zelí/bavlna	60,225	5,401	-8,484	1,110	560
č.zelí/vlna	48,225	4,7397	1,518	2,398	560
zelí+soda/vlna	51,320	-3,562	-2,762	2,046	590
zelí+ocet/vlna	51,073	21,968	-5,648	2,611	540

Tab.20 CIE-Lab , K/S hodnoty a vln.délka remisního minima některých zde vyobrazených tkanin (Obr.52 a 54) barvených antokyany



Obr.53 Vlna / vinné slupky - remisní křivka tkaniny



Obr.54 Vlněná tkanina obarvená červeným zelím, červeným zelím s octem, červeným zelím se sodou a černým bezem (zleva doprava)

7. Měření procenta vytažení antokyanů z lázně

Problematika obecně nízkého vytažení přírodních barviv z lázně vlivem nízké afinity k vláknům a postup stanovení procenta vytažení barviv z barvicí lázně při barvení textilií je popsán v kapitole 8.4 teoretické části. Výpočet relativního vytažení barviva z lázně, který šikovně obchází použití absorpčního koeficientu, byl vypočítán podle vztahů (15) a (16) [54]

K barvení byl použit extrakt ze slupek tmavých hroznů vinné révy, a to v množství 20 g sušených slupek (odpovídá zhruba 60 g čerstvých slupek) + 100 ml destilované vody. Po krátkém varu (cca 10 minut) byl extrakt zfiltrován, do jednotlivých barvicích patron bylo dávkováno vždy 20 ml extraktu a 30 ml pufru, takže vzniklo 5 barvicích lázní s pH 1, pH 3,2, pH 5,2, pH 6 a pH 8,2. (Obr.55) Z každé lázně bylo ještě před samotným barvením odebráno mikropipetou 100 μ l, v odměrných 10 ml baňkách toto množství doplněno příslušným pufrem na objem 10 ml (čímž byly barvicí lázně 100x naředěny pro fotometrii) a všechny vzorky původních lázní byly proměřeny na absorpčním spektrofotometru. Hodnoty absorbancí v absorpčních maximech byly zaznamenány jako výchozí hodnoty původních lázní A_0 .

Do každé barvicí lázně byl vložen 1 g vlněné tkaniny, délka lázně tedy byla u všech vzorků 1: 50. Barvení proběhlo při varu během 30 minut, tkaniny byly poté ponechány v chladnoucích lázních po několik hodin.

Pro nedostatek pufrů nebyly tkaniny po barvení oplachovány, vzorky k fotometrii lázní po vyprání byly odebírány z lázní pouze po vyjmutí tkanin a jejich důkladném vyždímání (pro fotometrii bylo zvoleno ředění zbytkových lázní opět 100x), proto je skutečná hodnota vytažení barviv z lázní o nižší, neboť vyjmuté tkaniny si na svém povrchu odnesly i určité množství povrchově ulpělého barviva, které by se jinak oplachem ještě strhlo a vrátilo zpět do lázně.

V následujícím přehledu (Tab.21) jsou uvedeny naměřené hodnoty absorbancí původních a zbytkových lázní a vypočtená procenta vytažení (%E), s vědomím zatížení měření výše popsanou chybou.

pH	A_0	A_z	%L	%E
1	0,310165	0,113297	36,5	63,5
3,2	0,190445	0,092682	48,7	51,3
5,2	0,135294	0,042862	31,7	68,3
6	0,143921	0,021286	14,8	85,1
8,2	0,069122	0,010498	15,2	84,8

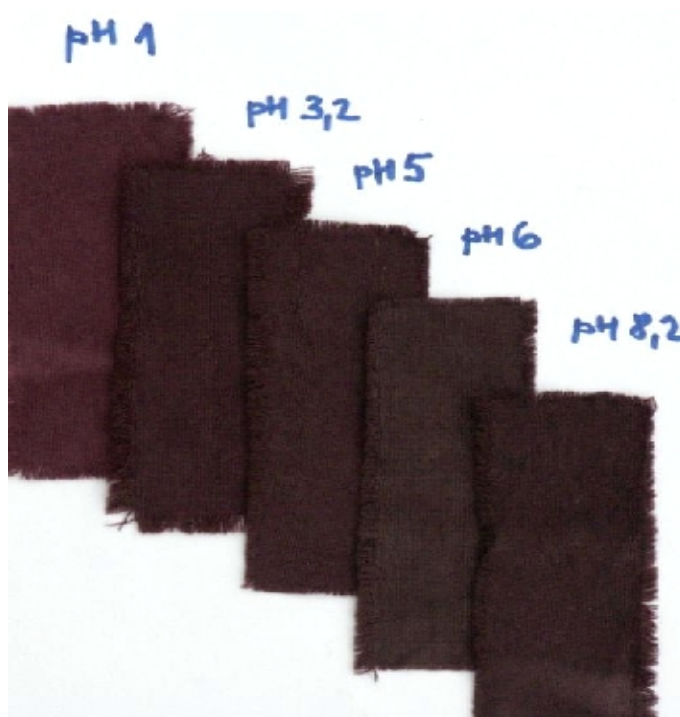
Tab.21 Procento vytažení barviva z lázně (vlna/slupky z hroznů)

A_z , A_0 absorbance zbytkové a původní lázně

% L procento barviva zbylého v lázni

%E procento vytažení z lázně

ředění původní i zbytkové lázně: 100x



Obr.55 Vlněná tkanina obarvená vinnými slupkami při pH 1 - 3,2 - 5,2 - 6 a 8,2

Další měření na vytažení barviva z lázně bylo provedeno se šťávou z červeného zelí, kterou byla barvena vlna i bavlna opět při různých hodnotách pH, ředění zbytkových i původních lázní 80x, délka barvicích lázní 1:30, tkaniny byly po barvení vyždímány a 2x příslušným pufrem opláchnuty, oplachová tekutina byla vždy přidána ke zbytkové lázni po barvení a opět na základě proměřených absorbancí původních lázní A_0 a zbytkových lázní A_z vypočteno přibližné procento vytažení barviva z lázně (Tab.22)

pH	A_0	A_z vlna	A_z bavlna	%E vlna	%E bavlna
1	0,731399	0,598435	-	18,2	-
3	0,736298	0,542435	0,618430	26,3	16,0
4	0,605011	0,372330	0,458451	38,5	24,2
4,5	0,584420	0,352661	-	39,7	-
5	0,442703	0,254044	0,324631	42,6	26,7
6	0,288498	0,195221	0,221537	32,3	23,2
7	0,285629	0,234070	0,205948	18,1	27,9
8	0,339828	0,236740	0,196198	30,3	42,3
9	0,307221	0,227835	0,190247	25,8	38,1

Tab.22 Procento vytažení barviva z lázně (vlna, bavlna/červené zelí)

Diskuze:

I přesto, že na základě hodnot procenta vytažení antokyanů z lázně získaných z jediného měření nelze s určitostí říci, zda v oblasti pH blízko izoelektrického bodu vlny (pH 4,5) dochází k výrazným změnám v natažení barviva na vlákno (překrývání se oblastí protonizace vlny pod jejím izoelektrickým bodem s oblastí, kdy antokyany přechází ze stavu flavyliového kationtu do neutrálního stavu a posléze do stavu anionické báze), lze přesto konstatovat, že hodnoty relativního **vytažení antokyanů z lázně (%E) na vlnu se pohybovaly kolem 35%, u bavlny kolem 25%** (vycházejme především z hodnot měření v kyselém prostředí, kde předpokládáme nejmenší chybu měření vzhledem k významnému absorpčnímu píku při vln.délce kolem 520-550 nm).

Vzhledem k nízké afinitě přírodních barviv k textilním vláknům bylo nižší procento vytažení z lázně předpokládáno a tyto naměřené hodnoty lze považovat u přírodních barviv za celkem vysoké a přijatelné.

Nebud' me však příliš optimističtí. Otázkou totiž zůstává, zda má celkový pokles absorbance zbytkové lázně skutečně na svědomí pouze tkanina, která barvivo natáhla do svých vláken. Vzhledem k tepelné degradaci antokyanů musíme předpokládat, že určitá část barviva podlehne při varu rozkladu. Dle Tab.10-17 klesá obsah antokyanů v lázni u různých rostlinných šťáv různě, nejvýraznější pokles antokyanů byl zaznamenán u borůvky, kdy už při první hodině varu klesl jejich obsah téměř na polovinu původního množství, černý bez i červené zelí se v 1.hodině varu zdají být ještě poměrně stabilní, u vinné révy je pokles obsahu antokyanů plynulý.

Není však jisté, zda tepelná degradace antokyanů probíhá stejně rychle i ve zředěné barvicí lázni, ve vlákně samotném během barvení a dále vlivem různých přísad do barvicí lázně (v tomto případě barvení v přítomnosti různých pufrů).

Experiment byl doplněn o měření procenta vytažení barviva z lázně při barvení bez ovlivnění pH a za studena, respektive při pokojové teplotě po dobu 6 hodin (vlna/červené zelí), délka lázně 1:30 (1,5 g vlněné tkaniny / 50 ml barvicí lázně- čisté neředěné šťávy). Po praní byl proveden důkladný oplach tkaniny intenzívním protřepáváním v nádobce s 50 ml studené destil.vody a s 50 ml horké destil.vody + ždímání. Oplachové tekutiny byly přidány ke zbytkové lázni, čímž vzniklo 3x větší naředění oproti lázni původní. (Tab.23)



Obr.56 Vlněná tkanina barvená za studena (zdola nahoru: červené zelí, černý bez, vinné slupky)

	A_0	A_z	$\lambda_{\text{max.}}$	%E
ČERVENÉ ZELÍ	0,257538	0,077988	550 nm	9,15

Tab.23 Procento vytažení barviva z lázně (vlna/červené zelí, barveno za studena)

Závěr:

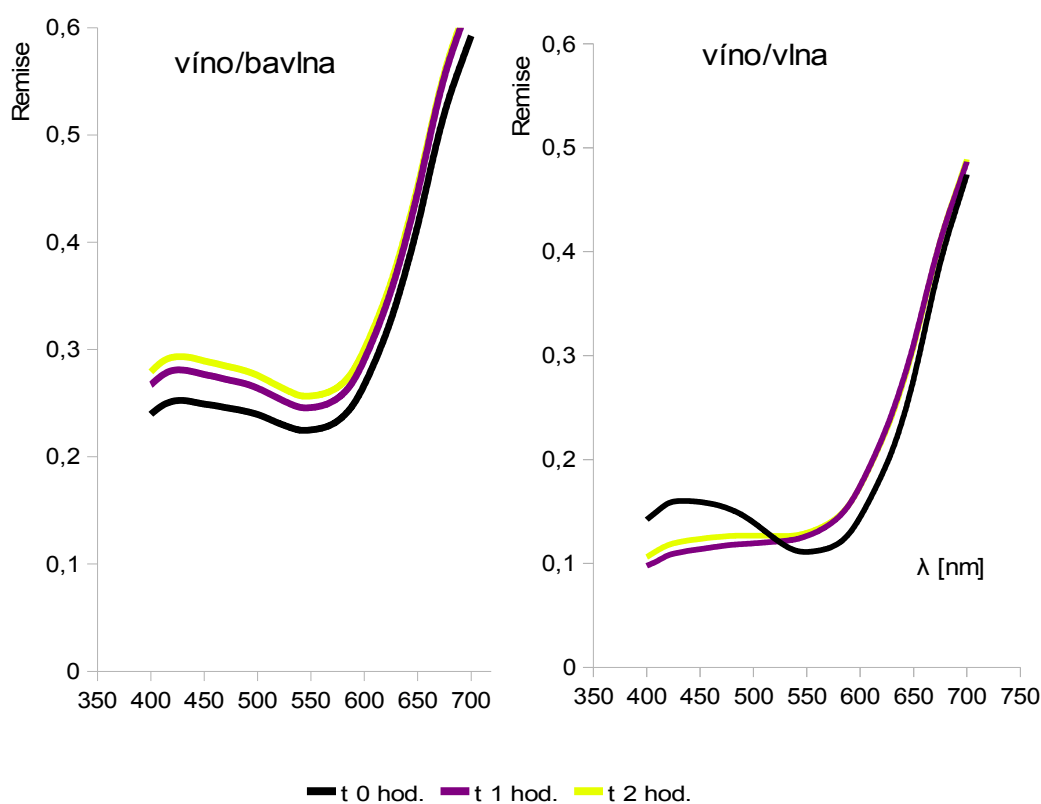
Vzhledem k termolabilitě antokyanů dochází při samotném barvení za varu k různě rychlému poklesu obsahu antokyanů v barvicí lázni, proto není vhodné dobu varu příliš prodlužovat. Hodnoty vytažení barviva z lázně se při barvení ve velmi slabé barvicí lázni, kdy dochází k vyššímu vytažení barviva z lázně než v lázni koncentrované, pohybovaly u vlny kolem 35% a u bavlny kolem 25%, vzhledem k tepelné degradaci antokyanů to ale znamená, že samotné procento vytažení barviva z lázně při barvení textilií je o něco menší, než ukazuje pouhé měření absorbancí původní a zbytkové lázně. Na základě měření vytažení barviva z lázně při barvení v koncentrované barevné lázni (čistá šťáva) za studena lze říct, že tato hodnota u vlny není nižší než 10%. (Takovéto barvení sice přináší další barevné odstíny (viz Obr.56), jako světle modrá barva na vlně při barvení červeným zelím nebo hnědorůžová na vlně při barvení černým bezem, nelze však počítat s příliš hlubokým probarvením vláken a tudíž ani s větší stálostí. Toto barvení bylo zvoleno jen pro zjištění minimálního procenta vytažení barviva z lázně).

8. Měření stálosti na světle a v praní

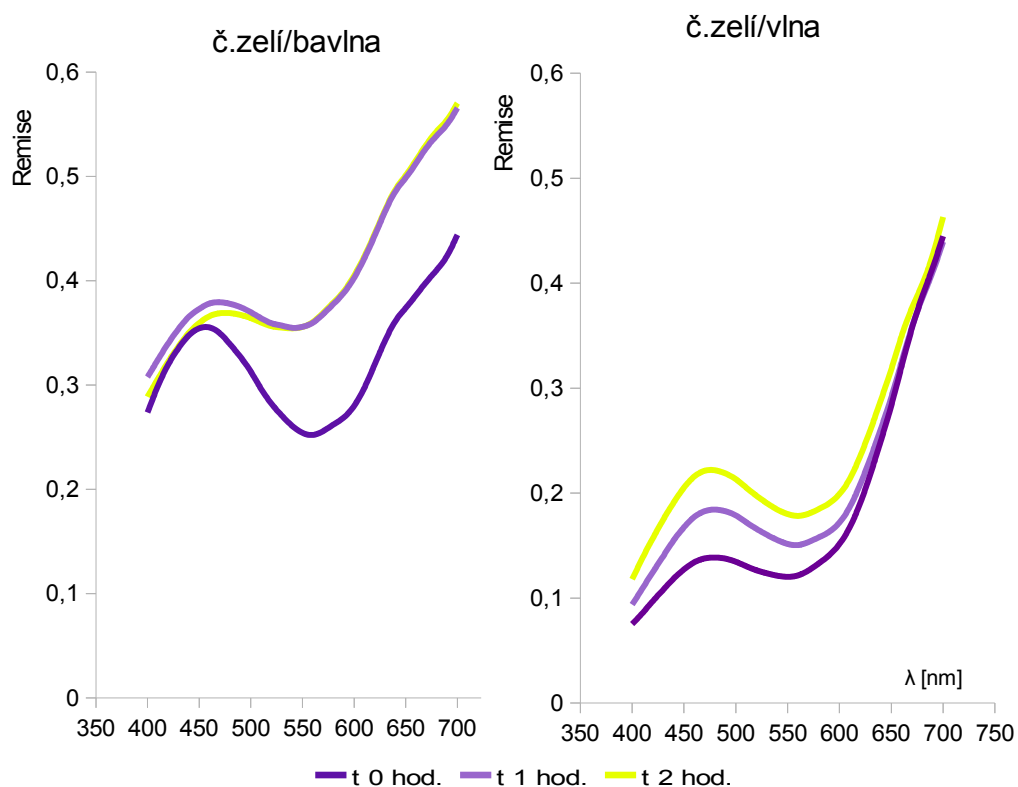
Testování **stálosti na světle** byly podrobeny vzorky bavlněné a vlněné tkaniny obarvené antokyany z borůvek, červeného zelí, černého bezu a slupek z tmavých hroznů a z červené cibule. Některé vzorky byly vystaveny přímému slunečnímu svitu po dobu několika dnů, některé byly ozařovány domácím UV zářičem po dobu 1-2 hodin a některé byly testovány na přístroji UVCON (typ Atlas UC-327-2), který kombinuje radiační energii ze zářivek v rozsahu vlnových délek pod 250 nm, kondenzaci vody a teplotu (50 °C).

Nejhorší stálost na světle vykazovaly dle očekávání tkaniny nabarvené na nejsvětlejší odstín, a to především tkaniny obarvené červeným zelím. Na jarním slunci se barva na tkaninách rozložila již během 2-3 dnů (polojasné počasí, sluneční svit jen po několik hodin denně), což dle modré stupnice stálosti odpovídalo stupni 1.

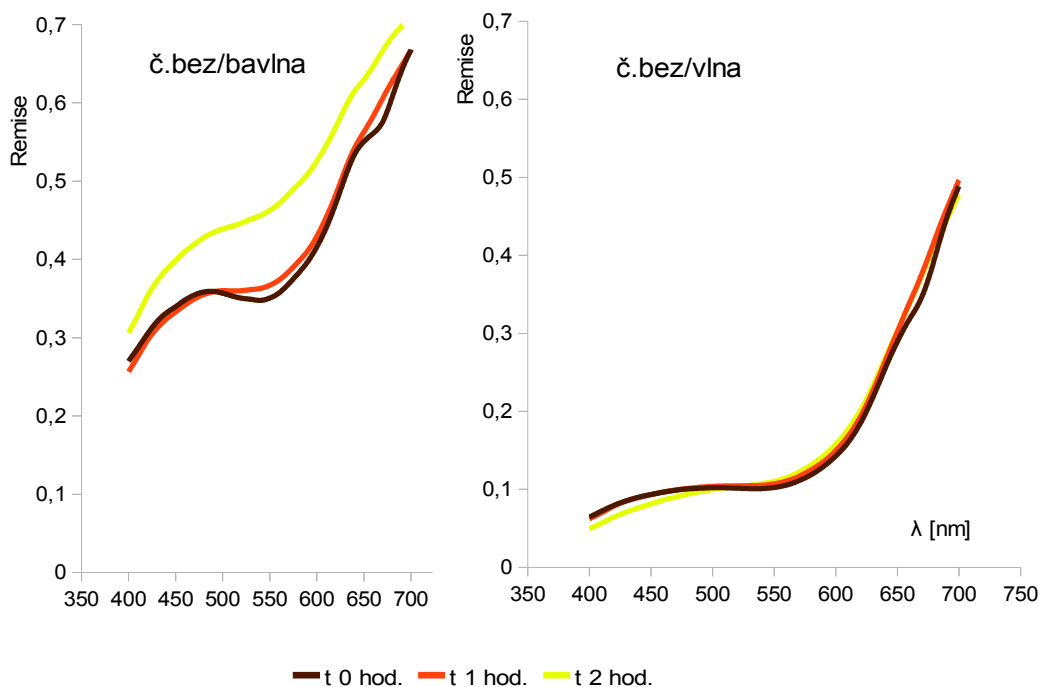
Grafy na Obr.57-60 znázorňují remisní křivky bavlněné a vlněné tkaniny obarvené slupkami z tmavých hroznů, šťávou z červeného zelí, černého bezu a slupkami červené cibule, které byly ozařovány domácím UV zářičem po dobu 1 a 2 hodin.



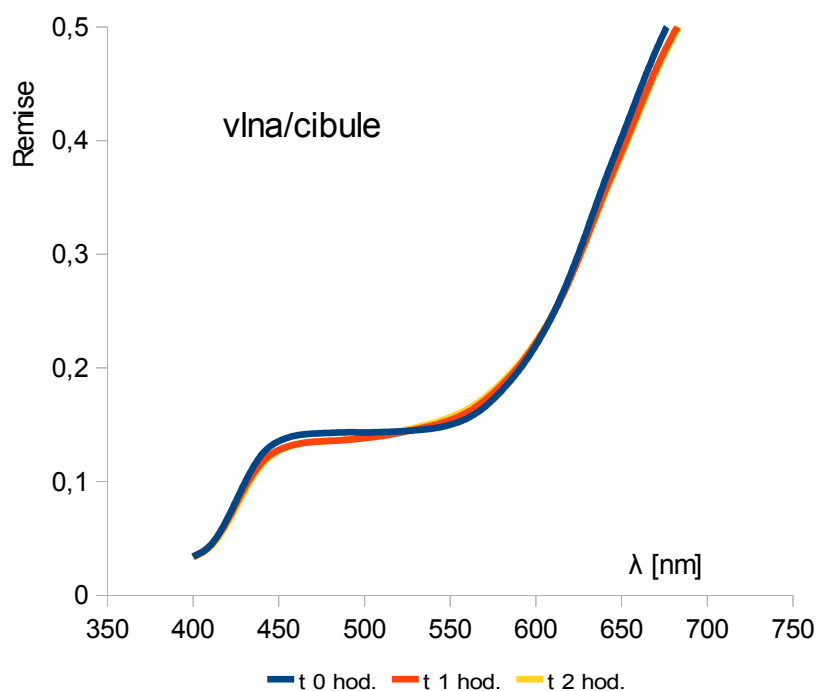
Obr.57 Změny remise tkanin po expozici UV zářením 1 a 2 hod.
(bavlna/vínná réva, vlna/vínná réva)



Obr.58 Změny remise tkanin po expozici UV zářením 1 a 2 hod.
(červené zelí / bavlna a červené zelí / vlna)



Obr.59 Změny remise tkanin po expozici UV zářením 1 a 2 hod.
(černý bez / bavlna, černý bez / vlna)



Obr.60 Změny remise vlněné tkaniny po expozici UV zář. 1 a 2 hodiny (červená cibule / vlna)

Je zajímavé, že se nejen antokyany z různých rostlin chovaly různě, ale i táž barviva reagovala na UV osvit odlišně na vlně a bavlně.

Hroznové víno:

bavlna - plynulý nárůst remise, postupná ztráta odstínu

vlna - už po 1 hodině expozice přechod z bordó odstínu do hnědé

Červené zelí:

bavlna - výrazná ztráta barevnosti (z původně světle fialové) už během 1.hodiny expozice

vlna - postupný rozklad barviva a snižování sytosti fialového odstínu už během 1.hodiny expozice

Černý bez:

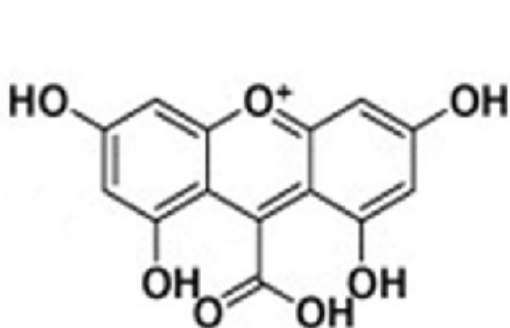
bavlna - výrazný nárůst remise a rozklad barviva až po 2 hodinách expozice

vlna - během osvitů nedošlo k pozorovatelným změnám (středně sytý odstín hnědavé barvy přetrval i po expozici)

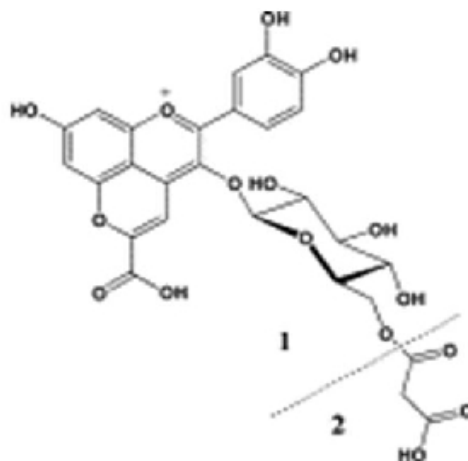
Červená cibule:

Ani zde se se středně sytým hnědavým odstínem na vlněné tkanině během 2 hodin osvitu UV zářičem nestala žádná viditelná změna, ovšem na vybarvení se u cibulových slupek podílí další pro cibuli typická barviva, flavonoid kvercetin a jeho oxidativní produkt kyselina cepaiková (9-karboxy- 1,3,6,8- tetrahydroxyxanthylum, Obr.61), kterou nedávno identifikovali japonští vědci [62].

Také samotné antokyany ve slupkách červené cibule mají trochu odlišnou strukturu od antokyanů popisovaných v této diplomové práci, jde o 3-glukopyranosid a 3- malonyl-glukopyranosid aglykonu karboxypyranokyanidinu (Obr.62). [63]



Obr.61 Kyselina cepaiková [62]



Obr.62 Antokyan v červené cibuli [63]

Expozici UV záření na přístroji UVCON byly spolu se vzorky barvených tkanin vystaveny také vzorky z modré stupnice pro testování světlostálostí. I zde se zhruba po 3 hodinách jako první odbarvily světle fialové textilie barvené červeným zelím, a to v době, kdy ještě nebyl viditelně narušen stupeň 1 modré stupnice. Po 6 hodinách UV expozice bylo nejvíce narušeno vybarvení červeným zelím na bavlně i vlně a vybarvení černým bezem na bavlně- tedy nejsvětlejší odstíny spolu s mírně narušeným stupněm 1 modré stupnice. Po celkově 12 hodinách expozice UV zářením byly ve vizuelně takřka neporušeném stavu pouze nejsytější bordó odstíny na vlně (barveno borůvkami a vinnými slupkami), ostatní středně syté odstíny fialové na bavlně (barveno borůvkami a vinnými slupkami) a vlně (barveno černým bezem) již byly poškozeny. V této době byl už narušen stupeň 2 modré stupnice.

Testování **stálosti v praní** bylo provedeno praním v uzavřených nádobkách, kam bylo dávkováno vždy 1 ml pracího prostředku pro barevné jemné tkaniny (Perwoll Color Magic) do 100 ml vody o teplotě 30 °C, (lázeň nebyla dále alkalizována) a do této lázně byly vloženy obarvené tkaniny spolu s vlnou jako doprovodnou tkaninou.. Praní bylo prováděno průběžným protřepáváním nádobek po dobu 60 minut. Poté byly vzorky opláchnuty, odděleně vysušeny a hodnoceny porovnáním s původním vybarvením pomocí šedé stupnice stálosti.

Závěr:

V hodnocení světlostálosti textilií barvených antokyany lze konstatovat, že z testovaných vzorků vydržely nejméně tkaniny s nejsvětlejším vybarvením, tj. tkaniny barvené červeným zelím. Tyto barvy se na světle rozkládaly velmi rychle a jejich stálost nedosahovala téměř ani stálosti stupně 1 modré stupnice.

Středně sytá vybarvení (bavlna barvená borůvkami a vinnými slupkami a též vlna barvená černým bezem) odpovídala stálostnímu stupni 1-2 modré stupnice.

Jako nejodolnější lze hodnotit velmi sytá vybarvení vlněných tkanin, kterých bylo dosaženo při barvení vlny borůvkami a vinnými slupkami. Po 12 hodinách osvitu na přístroji UVCON u nich došlo k nepatrnému posunu odstínu do hněda, jejich stálost bych hodnotila stupněm 2-3 modré stupnice, což je u textilního barviva stále hodnoceno jako malá stálost na světle.

Také stálosti v praní byly u různých vybarvení a tkanin odlišné. (Obr.63) Nejhorší stálost v praní, a to stupeň 1-2 vykazovaly bavlněné tkaniny nabarvené na světlý odstín (černý bez a červené zelí), bavlněná tkanina nabarvená vinnými slupkami odpovídala stálostnímu stupni 3. Stupni 3 odpovídaly dle očekávání také světleji nabarvené vlněné tkaniny, které byly barveny za studena zelím, č.bezem a vinnými slupkami. Nejlepší stálosti v praní, a to stupeň 4-5 vykazují polyamidová a vlněná tkanina obarvené na nejsytější odstíny borůvkami a vinnými slupkami, též polyamidová tkanina obarvená černým bezem. K zapouštění na doprovodnou vlněnou tkaninu nedošlo ani v jednom případě.



Obr.63 Vzorky barvených tkanin před a po praní (vždy zleva doprava: vlna barvená zastudena, vlna barvená při varu, bavlna, polyamid, vždy nahoře vzorky před praním, dole po praní), shora dolů: č.bez, č.zelí, víno

9. Závěrem

Antokyany jsou bezesporu zajímavou skupinou přírodních látek. Na první pohled každého zaujmou svojí bohatou barevností, kterou se prezentují především v rostlinných květech, plodech a listech. Při bližším pohledu nás překvapí jejich chameleonní schopnost měnit barvy, a to nejen ve zkumavkách vlivem různě kyselých roztoků. Mnohé rostliny mění své zbarvení díky antokyanům v průběhu života v závislosti na podmínkách prostředí, ve kterém rostou a kvetou- třeba hortenzie nebo hadinec.

Ten skutečný obdiv však u člověka vyvolají až při detailním studiu. Tak jako jiné přírodní materiály jsou i antokyany velmi proměnlivé nejen svou barevností, ale i dalšími vlastnostmi a strukturou a při jejich několikaměsíčním zkoumání mi nejednou proběhla hlavou vulkánská hláška „Infinite diversity of infinite combinations“ ze seriálu Star Trek .

Čím více jsem se snažila antokyany proměřit a zanalyzovat, tím více jsem zjišťovala, do jak heroického a ošidného úkolu jsem se to vlastně pustila. Za každým měřením, které mi mělo dát, jak jsem doufala, jasnou odpověď, se vynořila kupa dalších otázek, pochybností, nejasností a námětů pro další experimenty a proměřování. Odpovědi jsem během zkoumání dostala jen pár: barevné změny, termolabilita, rychlý rozklad v zásaditém prostředí, proměnlivý obsah v rostlinném materiálu, překvapivé barevné odstíny na textiliích, antioxidační účinek.

Kritickým pohledem textilního barvíře bych na antokyanech našla jistě mnohá negativa - ostatně jako u přírodních barviv obecně - nízký obsah barviva v rostlinném materiálu, nijak závratné procento vytažení barviva na textil, nestabilní barevný odstín, horší stálosti, potíže s jejich produkcí a zpracováním, sezónní dostupnost.

Je to pochopitelné: přírodní barviva nebyla vytvořena pro nás a naše potřeby. Dobře slouží především rostlinám samotným v jejich boji o existenci a částečně i jejich přímým konzumentům, ke kterým patříme i my. Člověk by si však rád z tohoto koláče ukrojil ještě větší díl, a proto přemýšlíme, jak i tyto přírodní látky změnit na suroviny, ze kterých bychom měli ještě jiný prospěch.

Při hodnocení využití antokyanů v textilním průmyslu jsem spíše skeptická - průmyslové barvení textilií bezinkami či dokonce borůvkami si opravdu nedokážu představit, nicméně je tu i jiný aspekt, a to využití odpadů s obsahem antokyanů, které produkují konzervárny, moštárny nebo vinařský průmysl.

Žijeme v době, kdy se nejrůznější odpady stávají významnou komoditou a vzhledem ke značným objemům těchto odpadů by jejich další zpracování a využití mohlo být nejen ekologickým, ale i ekonomickým přínosem.

Rakouská studie [61] zaměřená na textilní využití antokyanů ze slupek vinné révy, jejíž autoři sledovali vliv moření textilií taninem a kamencem na vybarvení vinnými antokyany, uvádí, že jen v Rakousku se při výrobě vína každoročně vyprodukuje 20 - 25 tisíc tun odpadu z vylisovaných hroznů. Takové objemy odpadu už stojí za výzkum jejich využití, třeba i v textilním barvířství.

Některé země, jako je Indie nebo Turecko, používají přírodní barviva tradičně, jiné země, typicky Rakousko, zažívají renezanci zájmu o přírodní barviva a v souvislosti s ekologií a zájmem o přírodní produkty zde dostává stále větší prostor výzkum možností jejich využití v textilním barvířství. „Eko“ textilie barvené přírodními barvivy z rostlinných odpadů by si jistě našly své zákazníky i na našem trhu.

Takto využít by mohl být nejen odpad z produkce vína, podobně produkují sezónní odpad z třešní, višní nebo černého rybízu i moštárny - tyto plodiny ovšem nebyly předmětem studia v této diplomové práci.

Pominu-li barvení, stále tu zůstává nesporný nutriční význam antokyanů a v neposlední řadě i estetický účinek. Nemusíme přeci vše kolem nás pouze využívat. Někdy se prostě stačí jen potěšit pestrou přehlídkou barviček, kterou nám příroda zdarma a nezištně předvádí od jara do podzimu....



Obr.64 Antokyany kolem nás...

Použitá literatura:

- [1] Wikipedia, on line <http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page>
- [2] Davídek J., Hajšlová J., Pokorný J., Velíšek J. : *Chemie potravin*. Skriptum VŠCHT, Praha 1991
- [3] Slanina J., Tábořská E.: *Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka*. Chem. Listy 98, 5 /2004, p.239-245
- [4] Pokorný J.: *Application of phenolic antioxidants in foodproducts*. EJEAFChe, 7/2008
- [5] Matějková Š., Gut I.: *Polyfenoly v potravě jako protektivní látky v aterosklerotickém procesu*. Remedia 10, 4/2000, p.192-201
- [6] Mulleder U., Murkovic M., Phannhauser W.: *J.Biochem.Biophys.Methods* 53, 61/2002
- [7] Renaud S., de Lorgeril M.: *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet, 1992, p.1523-1526
- [8] Touriño S., Lizárraga D. et al.: *Antioxidant/prooxidant effects of bioactive polyphenolics*. EJEAFChe, 7/2008
- [9] Olukemi et al., *Hibiscus sabdarifa and Sorghum bicolor as natural colorants*. EJEAFChe, 4/2005
- [10] Xavier M.F. et al.: *Extraction of Red Cabbage Anthocyanins: Optimization of the Operation Conditions of the Column Process*. Braz.arch.biol.technol. 51, 1/2008, p.143-152
- [11] Ondrejovič M., Maliar T., Polívka L., Šilhár S.: *Polyfenoly jablk*. Chem.Listy 103, 2009, p.394-400
- [12] Příbela A.: *Analýza potravin*, STU Bratislava, 1991, p.130-133
- [13] Poznámky k přednáškám z Fyzikál.chemie I., on line <http://web.natur.cuni.cz/~zuskova/Td2b6_s.pdf>
- [14] Klejdus B., Kubáň V.: *Rostlinné fenoly v allelopatii*. Chem.listy 93, 1999, p.243-248
- [15] Dobiáš P., Pavlíková P., Adam M., Ventura K.: *Využití extrakce nadkritickou tekutinou a extrakce v Soxhletově extraktoru pro izolaci a stanovení vybraných antioxidantů v bylinách*. Chem.Listy 104, 2010, 572-581
- [16] Basařová G.: *Pivovarsko-sladařská analytika*. Merkanta, Praha, 1993
- [17] Faller A.L., Fialho E.: *Polyphenol availability in fruits and vegetables consumed in Brazil*. Revista de Saúde Pública, 43(2)/2009, p.211-218
- [18] Zloch Z., Čelakovský J., Aujezdská A.: *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu podpořeného finančně Nadačním fondem Institutu Danone*. Plzeň, 2004
- [19] Vrábková J., Neugebauerová J.: *Vliv způsobu pěstování na obsah antioxidačních látek Anethum graveolens L.* Ústav zelinářství a květinářství, MZLU Brno
- [20] DIN ISO 14502-1 *Determination of substances characteristic of green and black tea - Part 1: Content of total polyphenols in tea- Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent* (ISO 14502-1:2005 + Corrigendum 1:2006)
- [21] Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M.: *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*. Meth.Enzymol. 299, 1999, p.152-178

- [22] Martirosyan D.M.: *Functional foods for cardiovascular diseases*. D&A Inc., Richardson TX, USA 2005
- [23] Giusti M. M., Wrolstad R.E.: *Characterisation and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy*. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, F1.2, 2001, on line <<http://www.does.org/masterli/facsample.htm>>
- [24] Dvořáková M., Dostálek P., Hulín P.: *Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladinách, mladínách a pivech*. Kvasný průmysl 52, 2006, p.111-114
- [25] Wikipedie, on line <http://cs.wikipedia.org/wiki/Hlavn%C3%AD_strana>
- [26] on line <<http://www.hplc.cz/>>
- [27] Jurková M. et al.: *Analýza polyfenolů v pivovarských surovinách s využitím PSE - tlakové extrakce rozpouštědlem a metodou HPLC s CoulArray detekcí*. Kvasný průmysl 56, 1/2010, p.18-23
- [28] Selecký R., Šmogrovičová D.: *Antioxidační aktivita meziproduktů při výrobě piva*. Kvasný průmysl 52, 7-8/2006, p.226-228
- [29] Šulc M. et al.: *Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor*. Chem.Listy 101, 2007, p-284-291
- [30] Mikyška A., Krofta K., Hašková D.: *Hodnocení antioxidačních vlastností chmele a chmelových výrobků*. Kvasný průmysl 52, 7-8/2006, p.214-225
- [31] Karabín M., Dostálek P., Hofta P.: *Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství*. Chem.Listy 100, 2006, p.184-189
- [32] Vodrážka Z.: *Biochemie*. Academia Praha, 1992
- [33] Velišek J., *Chemie potravin*. Osis Tábor, 2002
- [34] Klejdus B.: *Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu*. Habilitační práce, UPOL, Olomouc 2004
- [35] Wilkinson A.P., Wähälä K., Williamson G.: *Identification and quantification of polyphenol phytoestrogens in foods and human biological fluids*. J.Chromatogr.B 777, 2002,p.93-109
- [36] Yun Shen, Liang Jin, Peng Xiao, Yan Lu, Jinsong Bao: *Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight*. J.Cereal Sc. 49, 2009, p.106-111
- [37] Jurišič Grubešič R., Vuković J., Kremer D.: *Flavonoid content assay: Prevalidation and application on Plantago L. species*. Acta Chimica Slovenica 54, 2007, p.397-406
- [38] Drábek J., Jalůvková M., Frébort I.: *Kvantitativní PCR detekce nepovoleného přibarvení vína bezinkami*. Chem.Listy 101, 2007, p.550-555
- [39] Schweppe H., *Handbuch der Naturfarbstoffe*. Ecomed Landsberg, 1993
- [40] Youxi Yuan , Li-Wei Chiu, Li Li: *Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage*. Planta 230, 2009, p.1141-1153
- [41] on line <<http://kluedo.ub.uni-kl.de/volltexte/2008/2263/pdf/DissertationSpormann.pdf>>
- [42] Möllerová J.: *Cvičení z botaniky pro lesní inženýrství, krajinné inženýrství a aplikovanou ekologii*. Skripta FLE, ČZU Praha, 2004
- [43] Youngson R.: *Antioxidanty. Cesta ke zdraví*. Jota Brno, 1995
- [44] Laboratorní průvodce, on line <http://www.labo.cz/mft/rad_pasma.htm>

- [45] Wiener J., Průšová M., Kryštůfek J.: *Chemicko-textilní rozbor*. Skriptum TU, Liberec 2008
- [46] on line <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Home>>
- [47] Why roses are red and violets are blue...
on line <<http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/features/water2wine.shtml>>
- [48] Padma S. Vankar et al.: *Rose anthocyanins as acid base indicators*. EJEAFCh 9, 5/2010, p.875-884
- [49] on line <<http://www.indiamart.com/kolorjet/products.html>>
- [50] on line <http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav13_en.pdf>
- [51] Kryštůfek J., Wiener J.: *Barvení textilií I*. Skriptum TU Liberec, 2008
- [52] Machaňová D.: *Předúprava textilií*. TU Liberec, 2007
- [53] Kryštůfek J., Machaňová D., Wiener J.: *Barvení textilií II*. Skriptum TU Liberec, in print (2012)
- [54] Kryštůfek J.: *Návody k praktickým cvičením z barvení textilií, 7. úloha*. On line <<http://www.ft.tul.cz/depart/ktc/index.php?page=pedcin>>
- [55] Košková B.: *Struktura a vlastnosti vláken*. VŠST Liberec, 1989
- [56] Vik M.: *Základy měření barevnosti I*. Skriptum TU Liberec, 1995
- [57] Kubelka P., Munk F.: *The Kubelka-Munk theory of reflectance*. Zeitung für Techn. Physik 12, 1931, p.593
- [58] Küster F.W., Thiel A.: *Chemické analytické výpočetní tabulky*. Academia, Praha 1988
- [59] Kumšta M.: *Porovnání fenolických látek ve vínech z křížení (Merlot x S 13666) x (Frankovka x Svatovavřínecké)*, Ústav vinohradnictví a vinařství, Lednice, MZLU, ?
- [60] Jansen G., Flamme W.: *Coloured potatoes (Solanum tuberosum L.) – anthocyanin content and tuber quality*. Genetic Resources and Crop Evolution 53, 2006, p.1321-1331
- [61] Bechtold T., Mahmud-Ali A., Mussak R.: *Anthocyanin dyes extracted from grape pomace for the purpose of textile dyeing*. J.Sci.Food Agric. 87, 2007, p.2589-2595
- [62] Ito Y. et al.: *Cepaic acid, a novel yellow xanthylum pigment from the dried outer scales of the yellow onion Allium cepa*. Tetrahedron Letters, 50, 28/2011, p.4084-4086
- [63] Fossen T., Andersen M.: *Anthocyanins from red onion, Allium cepa, with novel aglycone*. Phytochemistry, 62, 8/2003, p.1217-1220

Pozn.:

EJEAFCh Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry
 J.Biochem.Biophys.Methods .. Journal of Biochemical and Biophysical Methods
 Meth.Enzymol. Methods in Enzymology
 J.Chromatogr.B Journal of Chromatography B
 J.Cereal Sc. ... Journal of Cereal Science
 Braz.arch.biol.technol. Brazilian Archives of Biology and Technology
 J.Sci.Food Agric. Journal of the Science of Food and Agriculture